

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA
NORMAL Y PATOLÓGICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS CARCINOSARCOMAS DE ENDOMETRIO

MICHELE BISCUOLA

SEVILLA, 2018

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA
NORMAL Y PATOLÓGICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS CARCINOSARCOMAS DE ENDOMETRIO

Memoria que presenta para optar al título de Doctor el licenciado en Biología

Michele Biscuola

Directores de tesis:

Dr. José Palacios Calvo

Jefe de Servicio de Anatomía Patológica

HH.UU. Ramón y Cajal, Madrid

Dr. Ricardo González Cámpora

Catedrático de la Universidad de Sevilla

Departamento de Citología e Histología

Normal y Patológica

Universidad de Sevilla

Tutor de tesis:

Dr. Manuel de Miguel Rodríguez

Profesor titular de la Universidad de Sevilla

Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica

Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla



AGRADECIMIENTOS

A Laura

A Lucia e Irene

“El éxito consiste en ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo”

Winston Churchill

Mantener el entusiasmo durante la consecución de todos aquellos objetivos y retos que nos proponemos a lo largo de nuestras vidas es una ardua tarea que requiere mucha constancia, perseverancia, cierto grado de testarudez y obstinación junto con una buena dosis de optimismo. El camino que hay que recorrer en un trabajo de tesis puede ser largo y complicado pero el esfuerzo por obtener resultados científicamente interesantes, sean positivos o negativos, esperados o inesperados, siempre resultará enriquecedor. La experiencia que vamos adquiriendo y las experiencias que vamos viviendo, estarán ligadas o dependerán en gran medida de todas aquellas personas que nos guiarán, apoyarán y aconsejarán o, simplemente, compartirán con nosotros entrañables y divertidos momentos que harán que la rutina en nuestra vida diaria sea, desde luego, más llevadera.

Mi primer agradecimiento va a mi director de tesis, el Dr. José Palacios Calvo. Ha sido la primera persona que ha querido confiar en mí, a nivel científico y laboral, casi recién llegado a España cuando aún no sabía decir más que un puñado de palabras mal pronunciadas en castellano. Durante su jefatura, me he dejado cautivar por su capacidad organizativa y estratégica y, gracias a este trabajo de tesis, me dejé y he seguido dejándome guiar por sus profundos conocimientos científicos. Gracias por el apoyo, los consejos y la paciencia demostrada en todos estos años.

El siguiente agradecimiento va dirigido al co-director y al tutor de este trabajo de tesis, el Dr. Ricardo González Cámpora y el Dr. Manuel de Miguel Rodríguez, por su colaboración durante todo el proceso de revisión y corrección de este manuscrito.

Gracias a todos los profesionales y compañeros de la U.G.C. de Anatomía Patológica del H. Virgen del Rocío. En primer lugar a mis compañeras de laboratorio: a María José, a Ángela y a Mercedes por mantener la sonrisa, la compostura, la tranquilidad, incluso delante de situaciones y resultados claramente inexplicables, por confiar en mí y ayudarme con todas las tareas relacionadas con el laboratorio de Patología Molecular. Gracias a los compañeros del Biobanco: a Fernando, a Carolina y a Ana, por las conversaciones ético-científicas, la infinita paciencia con las innumerables peticiones de muestras de tejido en fresco cuando toda esperanza con el material tisular paraafinado se había esfumado, las bromas, los chistes y todo tipo de tertulia durante los almuerzos. El siguiente agradecimiento va dirigido a todos los patólogos, para los cuales necesitaría casi otra tesis para enumerar todo lo que he aprendido y los buenos momentos que he

compartido con todos vosotros. Gracias a David M., Lourdes, María Ángeles, Eloy, Rainiero, David C., Enrique, Juan José, Begoña, Teresa, Carmen, Esteban, Rocío, Miguel Ángel y María. Muchas gracias también a los compañeros del IBiS: Laura, María Ángeles, Juan y Elena por todas las aportaciones científicas y los debates relacionados con nuestros proyectos y publicaciones y por todos los momentos pasados juntos.

Y por supuesto, mi principal e infinito agradecimiento va dirigido a mi mujer Laura: por estar a mi lado, aportar alegría y positividad en todo momento, por ser mi motor de ilusión, por la paciencia y comprensión, por apoyarme y ayudarme a mantener vivo el entusiasmo en todo lo que hago. Gracias a ti y a todo esto, he podido redactar este trabajo de tesis.

*“El gran libro siempre abierto y que hay que hacer el esfuerzo de leer
es el de la Naturaleza.”*

Antoni Gaudí

RESUMEN

Los carcinosarcomas de endometrio (CS) son neoplasias muy poco frecuentes que se originan principalmente en el cuerpo uterino. Los datos moleculares presentes en la literatura siguen siendo escasos y principalmente se centran en las mutaciones descritas en los subtipos frecuentes y mejor conocidos, como los carcinomas endometrioides y no endometrioides de endometrio. En el presente trabajo de tesis hemos estudiado distintas alteraciones moleculares en los CS, que pudiesen representar nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos o nuevas dianas terapéuticas.

Se ha realizado un perfil mutacional basado en el estudio de un total de 238 mutaciones puntuales, distribuidas en 19 genes y 11 alteraciones cromosómicas locus-específicas junto con el estudio de aneuploidía de 7 cromosomas. Las mutaciones puntuales detectadas en los genes *PIK3CA*, *KIT* y *PDGFRA* y las alteraciones observadas para los genes *PTEN* y *CDKN2A* podrían representar nuevos biomarcadores predictivos de respuesta a tratamiento. Se han analizado las posibles diferencias entre el componente epitelial y mesenquimal así como la posible asociación entre la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas y las características histológicas de estas neoplasias. La elevada frecuencia de alteraciones en los genes *MYB* y *RREB1*, la monosomía del cromosoma 6 así como la amplificación del gen *MYC* constituyen los rasgos más distintivos de estas neoplasias. Se ha estudiado paralelamente una serie de 73 carcinomas de endometrio de alto grado para detectar posibles características moleculares, que pudiesen distinguir los CS del resto de tumores endometriales, evidenciando que los carcinomas serosos son las neoplasias endometriales de alto grado que comparten el mayor número de características moleculares con los CS. Por último, atendiendo a la nueva clasificación molecular del carcinoma de endometrio, hemos demostrado que los carcinosarcomas pueden pertenecer mayoritariamente al subgrupo molecular de neoplasias que demuestran alteraciones del gen *TP53* y un elevado número de copias génicas.

En conjunto, los resultados obtenidos aportan nueva información acerca de posibles biomarcadores pronósticos y predictivos para mejorar el manejo de los carcinosarcomas de endometrio.

ÍNDICE

ABREVIATURAS 18

1. INTRODUCCIÓN 20

1.1 Etiología	21
1.1.1 Estimulación hormonal	21
1.1.2 Factores constitucionales	21
1.1.3 Dieta	22
1.1.4 Predisposición genética	22
1.2 Factores pronósticos del carcinoma de endometrio	23
1.3 Clasificación	24
1.4 Histología	26
1.4.1 Carcinoma endometriode de endometrio (CEE)	27
1.4.1a Adenocarcinoma endometroide	27
1.4.1b Carcinoma mucinoso	27
1.4.2 Carcinoma no endometriode de endometrio (CNEE)	28
1.4.2a Carcinoma seroso	28
1.4.2b Carcinoma de células claras	28
1.4.3 Carcinoma indiferenciado	29
1.4.4 Carcinosarcoma	30
1.5 Inmunofenotipos y características moleculares de los CE	32
1.5.1 Defectos en la vía de reparación del ADN	32
1.5.2 Alteraciones en la cascada de señalización de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K)/Akt	35
1.5.3 Alteraciones en la cascada de señalización RAS-RAF-MEK-ERK	39
1.5.4 Alteraciones en la cascada de señalización del Factor de Crecimiento de los Fibroblastos (FGF)	40
1.5.5 Alteraciones en la vía de señalización WNT	40

1.5.6 Alteraciones en las ciclinas	43
1.5.7 Alteraciones en las cadherinas	43
1.5.8 Mutaciones en el gen ARID1A	44
1.5.9 TP53	45
1.5.10 El receptor de membrana HER2	47
1.5.11 Ploidía y alteraciones cromosómicas	47
1.5.12 Los nuevos cuatro subgrupos moleculares	49
1.6 Características moleculares de los carcinosarcomas	51
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIALES y METODOS	57
3.1 Población	57
3.2 Estudio histológico	58
3.3 Construcción de las Matrices de Tejido	58
3.4 Estudio inmunohistoquímico	59
3.5 Estudio de las alteraciones moleculares	60
3.5.1 Extracción de ácidos nucleicos	61
3.5.2 Estudio de las mutaciones del exón 3 del gen CTNNB1	61
3.5.3 Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH)	62
3.5.4 Estudio de mutación mediante espectrometría de masa	63
3.6 Análisis estadístico	67
4. RESULTADOS	69
4.1 Resultados I	69
4.1.1 Estudio inmunohistoquímico	69
4.1.2 Estudio de mutación	71
4.1.3 Estudio de las alteraciones cromosómicas	76
4.1.4 Estudio de Inestabilidad Genómica y Cromosómica	84

4.2 Resultados II	87
4.3 Resultados III	92
4.4 Resultados IV	103
5. DISCUSIÓN	106
6. CONCLUSIONES	138
7. BIBLIOGRAFÍA	141
ANEXO I: PUBLICACIONES	166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud.	24
Tabla 2. Características clínico-patológicas de los carcinomas endometrioides (tipo 1) y no endometrioides (tipo 2) de endometrio.	25
Tabla 3. Alteraciones moleculares de los CE (tipo 1) y CNE (tipo 2) de endometrio.	25
Tabla 4. Resumen de los 4 subgrupos moleculares evidenciados por el TCGA.	50
Tabla 5. Características clínico-patológicas de las muestras incluidas en el estudio.	57
Tabla 6. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica y condiciones.	59
Tabla 7. Sondas utilizadas para hibridación in situ con fluorescencia.	63
Tabla 8. Listado de los genes y mutaciones incluidos en el <i>OncoCarta</i> TM Panel.	66
Tabla 9. Resumen del perfil de expresión observado para cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados y su correspondiente frecuencia observada en los CS.	70
Tabla 10. Resumen de las alteraciones detectadas con las frecuencias observadas de los alelos mutados y nativos y su distribución en las 15 muestras positivas.	72
Tabla 11. Frecuencias y distribución de las mutaciones detectadas mediante ensayo <i>OncoCarta</i> TM en nuestra serie.	75
Tabla 12. Resumen de las alteraciones detectadas por cada uno de los <i>loci</i> estudiados y su correspondiente frecuencia observada en los CS.	78
Tabla 13. Resumen de las alteraciones detectadas por cada uno de los cromosomas estudiados y su correspondiente frecuencia observada en los CS.	82
Tabla 14. Las neoplasias que fuesen contemporáneamente positivas para al menos una mutación puntual, una alteración estructural y una alteración numérica se consideraron como GIN-positivas.	85
Tabla 15. Resultados obtenidos para cada uno de los genes y cromosomas estudiados en el componente epitelial y mesenquimal en función de la diferenciación histológica observada.	90
Tabla 16. Resultados obtenidos para cada uno de los genes y cromosomas estudiados en los distintos subtipos histológicos estudiados.	99
Tabla 17. Resumen de las frecuencias de las mutaciones detectadas en nuestro estudio y los datos presentes en la literatura.	112
Tabla 18. Posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de los CS.	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de tumores en mujeres españolas en el año 2012 (“Las cifras de cáncer en España”, SEOM 2016).	20
Figura 2. Ejemplo de carcinoma endometrioide de bajo y alto grado.	27
Figura 3. Ejemplo de carcinoma seroso con patrón papilar (A) y carcinoma indiferenciado (B).	29
Figura 4. Ejemplo de la íntima interconexión y mezcla de los componentes epitelial y mesenquimal o bien de la clara separación y delimitación de ambos, en función de la neoplasia.	31
Figura 5. Mecanismo de reparación de los mal apareamientos del ADN.	33
Figura 6. La vía de señalización PI3K/PTEN/Akt.	37
Figura 7. La vía de señalización Wnt.	41
Figura 8. Actividad de la proteína codificada por ARID1A en los CCC.	44
Figura 9. El equipo <i>Manual TissueArrayer</i> (MTA; Beecher) y la construcción de una matriz de tejido.	58
Figura 10. Esquema de la tecnología de espectrometría de masa MALDI-TOF.	64
Figura 11. Los 4 gráficos representan las frecuencias de los alelos nativos (G) y mutados (A) en 3 de las 6 muestras positivas para la mutación en el gen PIK3CA.	73
Figura 12. Los 2 gráficos representan las frecuencias de los alelos nativos (C) y mutados (A y T) detectados en las muestras MMT61 y MMT74 en el gen KRAS.	74
Figura 13. Electroferograma de la secuencia nativa del exón 3 del gen <i>CTNNB1</i> .	76
Figura 14. Frecuencia de distribución de las alteraciones cromosómicas detectadas en los CS.	77
Figura 15. Ejemplos de alteraciones detectadas mediante FISH de distintas sondas.	79
Figura 16. Ejemplos de alteraciones detectadas mediante FISH de distintas sondas.	80
Figura 17. Ejemplos de alteraciones detectadas mediante FISH de distintas sondas.	81
Figura 18. Las distintas anesomías detectadas en nuestra serie de CS.	83
Figura 19. Correlación entre la aneuploidía y el número de alteraciones detectadas.	86
Figura 20. Distribución de los casos con diferenciación Endometrioide/No Endometrioide y Homóloga/Heteróloga para el componente epitelial y mesenquimal respectivamente.	87

Figura 21. Distribución de la ganancia de los genes <i>ALK</i> y <i>MYCN</i> y de la aneusomía de cromosoma 2 en las muestras con componente epitelial de tipo endometriode y no endometriode.	88
Figura 22. Distribución de la ganancia/amplificación del gen <i>CCND1</i> en las muestras con componente epitelial de tipo endometriode y no endometriode.	89
Figura 23. Distribución de las alteraciones cromosómicas en los cuatro subtipos histológicos estudiados.	93
Figura 24. Media de alteraciones y su desviación estándar en función del subtipo histológico.	93
Figura 25. Diferencias observadas en el patrón de aneuploidía observada en los 4 subtipos histológicos.	94
Figura 26. La polisomía del cromosoma 6 se ha detectado con frecuencias parecidas entre los Carcinomas estudiados mientras que la monosomía resulta ser un hallazgo exclusivo de los CS.	94
Figura 27. Distribución de las anomalías del gen <i>RRBE1</i> en los cuatro subtipos histológicos estudiados.	95
Figura 28. Distribución de las alteraciones del gen <i>MYB</i> en los cuatro subtipos histológicos estudiados.	95
Figura 29. La amplificación del gen <i>MYC</i> se observó en los subtipo histológico de los CS, CE y CI.	96
Figura 30. Frecuencia de detección de la amplificación del gen <i>ERBB2</i> entre los grupos estudiados.	97
Figura 31. Distribución de la delección del gen <i>PTEN</i> en los subtipos histológicos.	97
Figura 32. La delección de los genes <i>CDKN2A</i> y <i>TP53</i> se observó principalmente en los CS seguidos de los CNE.	98
Figura 33. Mapa de calor o “heat-map” de la distribución de todas las alteraciones estudiadas entre las distintas muestras de carcinomas endometriales.	101
Figura 34. Correlación entre pérdida o aneusomía del gen <i>TP53</i> y la expresión nuclear de la proteína p53 entre los distintos subtipos histológicos.	102
Figura 35. Diferencia significativa entre el patrón de expresión de BAF-250 en los cuatro grupos estudiados.	102
Figura 36. Distribución de las muestras de carcinosarcomas atendiendo a la clasificación molecular.	103
Figura 37. Media de alteraciones y su desviación estándar de las muestras incluidas en los tres grupos moleculares propuestos.	104
Figura 38. Versión definitiva del algoritmo propuesto para la clasificación molecular de los 4 subgrupos de carcinomas de endometrio.	134

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

CCC: Carcinoma de célula clara

CE: Carcinoma de endometrio

CEE: Carcinoma endometrioide de endometrio

CI: Carcinoma indiferenciado de endometrio

CNEE: Carcinoma no endometrioide de endometrio

CNE: Carcinoma seroso de endometrio

CS: Carcinosarcoma uterino o de endometrio

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente (Fluorescent in situ hybridization)

H-E: Hematoxilina-eosina

IHQ: Inmunohistoquímica

IMS: Inestabilidad de microsatélites

MALDI-TOF: Ionización por Desorción con Láser Asistida por una Matriz y un analizador de Tiempo De Vuelo

MMR: Reparación de defectos génicos

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

p-valor: Valor de probabilidad de igualdad

TCGA: Proyecto “Atlas del Genoma del Cáncer”

TMA: Matriz de tejidos (Tissue Microarray)

1. INTRODUCCION

El carcinoma de endometrio es el tumor ginecológico maligno más frecuente en el mundo desarrollado, representando el 7% de todos los cánceres femeninos. En Estados Unidos se ha estimado que el pasado año 2015 se habrían diagnosticado 61.380 nuevos casos de tumores del cuerpo uterino, con 10.920 fallecimientos debidos a esta patología [1]. Cada año se diagnostican a nivel mundial aproximadamente 150.000 casos, situando por lo tanto el carcinoma de endometrio como el quinto tumor más frecuente entre las mujeres [2]. La incidencia de este cáncer varía considerablemente en función de los países, siendo más frecuente en Estados Unidos y Europa mientras que por ejemplo en Japón es de 4 a 5 veces inferior. Su incidencia en España en el año 2012 ha sido de 5.89/100.000 personas por año (Fig. 1) con una mortalidad de 3.09 cada 100.000 habitantes/año (Las cifras del cáncer en España. SEOM, 2016). La mayoría de los carcinomas de endometrio se presentan en mujeres postmenopáusicas, con un pico de incidencia entre los 55 y los 65 años, siendo menos de un 20% el número de nuevos casos que se diagnostican antes de los 40 años.

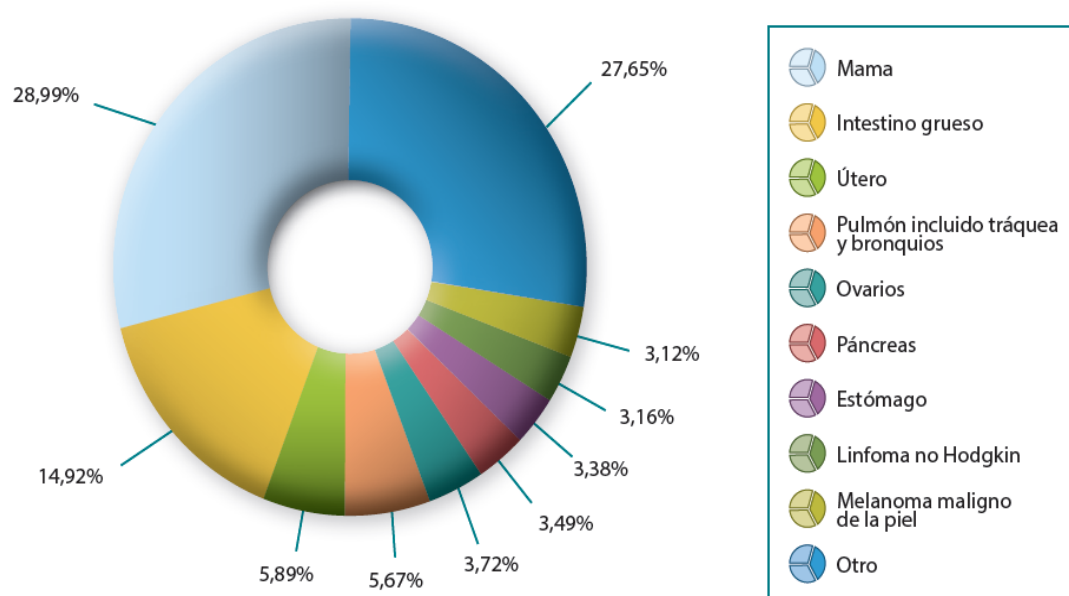


Figura 1. Incidencia de tumores en mujeres españolas en el año 2012 (“Las cifras de cáncer en España”, SEOM 2016).

1.1 Etiología

Los factores patogénicos asociados a este tipo de neoplasia son los siguientes:

- La estimulación hormonal
- Los factores constitucionales
- La dieta
- La predisposición genética

1.1.1 Estimulación hormonal

El factor etiopatogénico más importante es la estimulación endometrial por parte de los estrógenos sin la oposición de la progesterona, ya sea por estrógenos exógenos o endógenos. El cáncer de endometrio se asocia con el tratamiento hormonal sustitutivo sin gestágenos asociados, con los tumores ováricos productores de estrógenos como los tumores de la teca-granulosa y también a carcinomas ováricos endometrioides (aunque su patogenia no esté suficientemente aclarada), con situaciones de anovulación como el síndrome del ovario poliquístico (asociado a amenorrea, menstruaciones irregulares y nuliparidad) o el síndrome de Turner y con la hemorragia uterina disfuncional de la perimenopausia y menopausia tardía [3, 4].

Los datos sobre el riesgo de desarrollar un carcinoma de endometrio en pacientes sometidas a tratamiento con tamoxifeno son discordantes. Este fármaco, un modulador selectivo de los receptores de estrógeno, tiene efectos distintos en función de la edad de las pacientes: en mujeres en edad fértil demuestra una elevada actividad anti-estrogénica a diferencia de las pacientes en post-menopausia cuyo efecto es muy débil. Muchos estudios han evidenciado que existe riesgo aumentado de cáncer de endometrio aparentemente relacionado con la dosis y la duración del tratamiento, aunque otros autores han demostrado que no parece influir directamente sobre el desarrollo de esta neoplasia [3, 5-10].

1.1.2 Factores constitucionales

La obesidad está claramente asociada con el carcinoma de endometrio representando un evidente factor de riesgo, que depende de la mayor disponibilidad de estrógenos a nivel periférico a causa de la aromatización de los andrógenos en el tejido adiposo y a la baja concentración de las globulinas que se unen a las hormonas sexuales en las mujeres obesas [2].

La diabetes se ha asociado repetidamente con el riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia y el riesgo parece ser independiente de la obesidad.

Otros factores constitucionales que se han demostrado aumentar el riesgo de carcinoma endometrial incluyen la menarquía precoz, la menopausia tardía y la nuliparidad.

1.1.3 Dieta

El carcinoma de endometrio se correlaciona con una alta ingesta calórica, altos niveles proteicos y el consumo frecuente de carne, huevos, leche y grasas. Estos factores dietéticos, junto con un dispendio energético reducido, escasa actividad física y un estilo de vida sedentario son las causas principales de la obesidad que, como descrito previamente es un claro factor de riesgo patogénico.

1.1.4 Predisposición genética

El carcinoma de endometrio familiar se asocia con ~~un~~ mayor riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia a lo largo de la vida de una paciente, comparado con el riesgo de la población general. Los dos síndromes hereditarios que representan la causa más común de este tipo de tumor son el síndrome de Lynch y el síndrome de Cowden.

El síndrome de Lynch o síndrome del cáncer colorrectal no polipósico hereditario (CCNPH) se transmite de manera autosómica dominante y se caracteriza por la transmisión a nivel germinal de una mutación en uno de los genes implicados en la reparación del apareamiento erróneo del ADN (*MismatchRepair*, MMR), como por ejemplos los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. El diagnóstico clínico-patológico se basa en el cumplimiento de al menos uno de los criterios de Ámsterdam o de los criterios Bethesda. En las familias identificadas sobre la base de estos criterios, los pacientes afectados desarrollan principalmente cáncer colorrectal (CCR), con o sin cáncer de endometrio, con riesgos acumulativos del 70-80% a los 70 años. El seguimiento ginecológico anual es necesario para mujeres de más de 30 años.

El síndrome de Cowden (SC) es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de múltiples hamartomas en diversos tejidos y ~~un~~ alto riesgo de padecer cáncer de mama, tiroides, endometrio, riñón y colon. En la actualidad se cree que el 25% de los casos de SC están causados por mutaciones germinales en el gen *PTEN* (10q23), que codifica la proteína homónima, una fosfatasa con especificidad dual, homóloga de fosfatasa y tensina. El riesgo de carcinoma endometrial en mujeres con este síndrome se

estima entre el 5-10% comparado con el 2.6% de la población general. La atención y el tratamiento son multidisciplinarios y se basan en el genotipo de la paciente. Las mujeres deben realizarse mensualmente un autoexamen de senos, y anualmente un cribado mamográfico, así como ecografías transvaginales o biopsias de endometrio a partir de los 30 años.

1.2 Factores pronósticos del carcinoma de endometrio

El estudio de la pieza de histerectomía es necesario para establecer el estadio definitivo de un carcinoma de endometrio, ya que éste tiene importancia fundamental a la hora de determinar el pronóstico de la paciente y de decidir si es necesaria algún tipo de terapia complementaria (radioterapia, quimioterapia). Los factores pronósticos uterinos incluyen: 1) tipo histológico, 2) grado histológico, 3) profundidad de la infiltración en el miometrio, 4) invasión vascular, 5) presencia de hiperplasia atípica, 6) afectación del cérvix uterino, 7) estado de los receptores hormonales. Los factores pronósticos extrauterinos se resumen en: 1) citología peritoneal positiva, 2) afectación anexial, 3) metástasis en ganglios linfáticos pélvicos y/o para-aórticos y, 4) metástasis en peritoneo o vísceras vecinas.

1.3 Clasificación

La última clasificación de los distintos tipos de carcinoma de endometrio según la Organización Mundial de la Salud (OMS 2014) se resume a continuación en la Tabla n. 1 [11].

Epithelial tumours and precursors
Precursors
Hiperplasia without atypia
Atypical hyperplasia/Endometrioid intraepithelial neoplasia
Endometrial carcinomas
Endometrioid carcinoma
Squamos differentiation
Villoglandular
Secretory
Mucinous carcinoma
Serous endometrial intraepithelial carcinoma
Serous carcinoma
Clear cell carcinoma
Neuroendocrine tumours
Low-grade neuroendocrine tumour
Carcinoid tumour
High-grade neuroendocrine carcinoma
Small cell neuroendocrine carcinoma
Large cell neuroendocrine carcinoma
Mixed cell adenocarcinoma
Undifferentiated carcinoma

Tabla 1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud.

Desde el punto de vista clínico-patológico y en base a las alteraciones moleculares, las variantes más comunes del carcinoma de endometrio se pueden dividir en dos grupos. El primero, conocido habitualmente como tipo I, supone alrededor del 90% de los carcinomas de endometrio y, desde el punto de vista morfológico, corresponde al adenocarcinoma endometriode y sus variantes. Este subtipo histológico se ha asociado a estimulación endometrial por los estrógenos sin la oposición de la progesterona, obesidad, uso de gestágenos, así como a la presencia de hiperplasia endometrial [12]. El segundo subtipo histológico (tipo II), conocido también como carcinoma no endometroide, es mucho menos frecuente, suele presentarse en mujeres alrededor de la 7ª-8ª década de la vida, no se asocia a estimulación por estrógenos e incluye neoplasias de alto grado, como el carcinoma seroso y el de células claras. Las

principales características clínico-patológicas de estos tipos de carcinoma de endometrio se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Características clínico-patológicas de los carcinomas endometrioides (tipo 1) y no endometrioides (tipo 2) de endometrio.

Características	CEE o Tipo 1	CNEE o Tipo 2
Edad	Pre- y perimenopausia	Postmenopausia
Estimulación estrogénica	Frecuente	Infrecuente
Lesión precursora	Hiperplasia atípica	Carcinoma intraepitelial
Grado	Bajo	Alto
Invasión miometrio	Mínima	Profunda
Subtipo histológico	Endometriode	No Endometriode
Comportamiento	Estable e indolente	Progresivo y agresivo

Ambos subgrupos histológicos se caracterizan también por poseer claras diferencias moleculares, que apoyan la subdivisión dualística de esta patología (Tabla 3).

Tabla 3. Alteraciones moleculares de los CE (tipo 1) y CNE (tipo 2) de endometrio.

CEE o Tipo 1	CNEE o Tipo 2
<i>IMS</i>	<i>TP53</i>
<i>PTEN</i>	<i>LOH</i>
<i>KRAS</i>	<i>CDKN2A</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>ERBB2</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>CDH11</i>
<i>ARID1A</i>	<i>STK15</i>

Los otros subtipos histológicos que no se pueden clasificar claramente en uno de estos dos grupos (carcinoma epidermoide, carcinoma de tipo mixto y carcinoma indiferenciado) se consideran variantes de los carcinomas de tipo I o de los de tipo II, en base a las características clínico-patológicas, inmunohistoquímicas y moleculares observadas en los tumores.

1.4 Histología

1.4.1 Carcinoma endometrioide de endometrio (CEE)

Los carcinomas endometrioides de endometrio (CEE) o de tipo I representan alrededor del 80% de todos los carcinomas endometriales. Se desarrollan principalmente en mujeres pre- y peri-menopáusicas en el contexto de hiper-estrogenismo, obesidad y diabetes. Los tumores que se incluyen en este grupo son el adenocarcinoma endometrioide, sus variantes (villo-glandular, secretor y con diferenciación escamosa) y el carcinoma mucinoso. La mayoría de los tumores se desarrolla a partir de una hiperplasia endometrial, aunque en muchos casos el endometrio no neoplásico puede aparecer atrófico o poco proliferativo. A continuación, se comentarán los aspectos clínico-patológicos más relevantes de cada una de estos tipos histológicos de CEE.

1.4.1a Adenocarcinoma endometrioide

La mayoría de los adenocarcinomas endometrioides se caracterizan histológicamente por presentar glándulas bien definidas revestidas por células epiteliales atípicas de morfología columnar o cilíndrica, similares a las que se pueden observar en el endometrio normal. El adenocarcinoma endometrioide (ADCE) constituye en realidad un espectro de diferenciación histológica que abarca desde el adenocarcinoma bien diferenciado, que puede ser muy difícil de distinguir de la hiperplasia compleja con atipia, hasta el carcinoma pobremente diferenciado, que puede resultar casi imposible de separar del carcinoma indiferenciado (figura 2).

En su forma típica, el ADCE está compuesto por glándulas tubulares que en la mayoría de los casos son de mediano tamaño, aunque pueden oscilar desde un diámetro pequeño hasta glándulas dilatadas quísticamente. Los tumores pueden mostrar necrosis focal o confluyente de las glándulas o bien restos necróticos en las luces glandulares, especialmente en los adenocarcinomas pobremente diferenciados.

El adenocarcinoma endometrioide de tipo villo-glandular, que representa el 15-30% de todos los CEE, muestra una arquitectura en forma de papilas alargadas, finas y ramificadas, dispuestas alrededor de ejes fibrovasculares delgados, y normalmente entremezcladas con una proporción variable de glándulas endometrioides.

La variante secretora del ADCE representa un grupo de carcinomas de endometrio bien o moderadamente diferenciados en los que llama la atención la presencia de

vacuolas cargadas de glucógeno. Suelen ser tumores raros y deben distinguirse histológicamente de otras variedades de carcinoma de endometrio con presencia de células claras, dentro de las que la más frecuente es el carcinoma de células claras, asociado a un pronóstico agresivo.

La diferenciación escamosa es frecuente y se observa aproximadamente en el 25% de los adenocarcinomas endometrioides. Se presenta como un espectro morfológico con grados variables de atipia, que suelen ir paralelos a la atipia del componente glandular.

1.4.1b Carcinoma mucinoso

La diferenciación mucinosa es frecuente como ~~un~~ componente menor en los adenocarcinomas endometrioides y se define por la presencia de abundante mucina intracelular [13]. La diferenciación mucinosa ocurre en la mayoría de los casos en adenocarcinomas endometrioides bien diferenciados. Sólo en los raros casos de diferenciación mucinosa pura se permite el diagnóstico de “carcinoma mucinoso”, aunque esta distinción no tiene trascendencia clínica. Histológicamente, los tumores con diferenciación mucinosa pueden mostrar arquitectura papilar o cribiforme con núcleos redondeados, discretamente aumentados de tamaño, y diferenciación mucosa intra-citoplasmática.

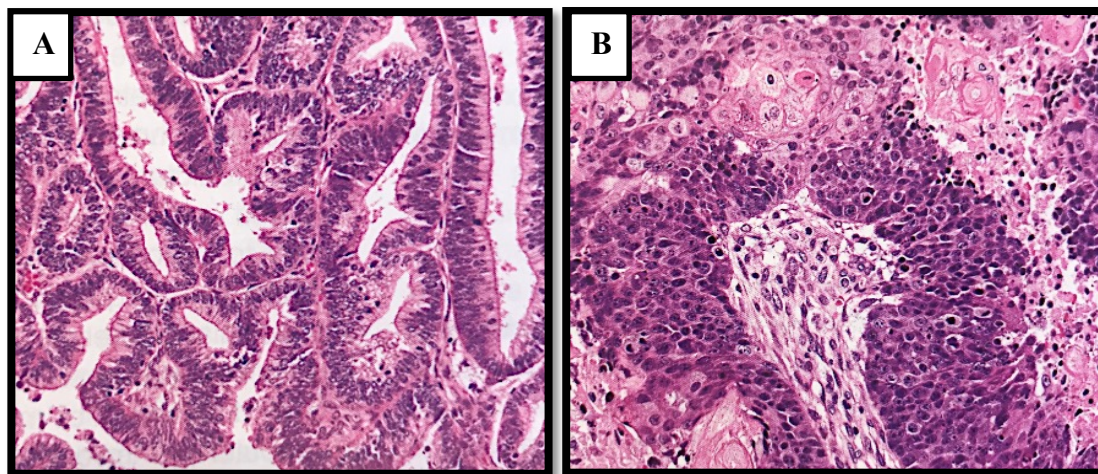


Figura 2. Ejemplo de carcinoma endometriode bien diferenciado de bajo grado [FIGO grado 1 (A)] y de alto grado [FIGO grado 3 (B)].

1.4.2 Carcinoma no endometriode de endometrio (CNEE)

Los carcinomas no endometrioides de endometrio (CNEE) o de tipo II representan alrededor del 10-15% de todos los carcinomas endometriales. Se desarrollan principalmente en mujeres post-menopáusicas y, a diferencia de los tumores de tipo I, no se correlacionan con hiperestrogenismo, obesidad ni diabetes. Suelen ser neoplasias de alto grado con comportamiento agresivo que presentan invasión miometrial. Los tumores que se incluyen en este grupo son el carcinoma seroso, considerado como el prototipo del CNEE y el carcinoma de células claras. A continuación, se comentarán los aspectos clínico-patológicos más relevantes de estos dos tipos histológicos.

1.4.2a Carcinoma seroso

El carcinoma seroso de endometrio supone entre el 5% y el 10% de todos los carcinomas de endometrio, dependiendo de las series consultadas [14, 15] La lesión precursora del este tipo de tumor es el carcinoma endometrial intraepitelial. Un dato importante a tener en cuenta es que a pesar de la ausencia de infiltración y de la escasa cantidad de tejido tumoral presente en algunos casos, el carcinoma seroso tiene una gran propensión a invadir ampliamente el miometrio y a diseminarse por vía linfática y la superficie peritoneal. Histológicamente se presenta como un carcinoma de endometrio pobremente diferenciado con papilas finas, fibrosas o edematosas con estratificación prominente celular (figura 3), que puede estar compuesta en muchos casos por células anaplásicas.

1.4.2b Carcinoma de células claras

El carcinoma de células claras representa menos del 1-5% de los CNEE y se caracteriza por la presencia de células tumorales con citoplasmas claros ricos en glucógeno y núcleos de alto grado [15, 16]. El tumor puede presentar diferentes patrones arquitecturales de crecimiento, que incluyen fundamentalmente sólido, papilar, glandular y tubular. Se asocian a un curso biológico más agresivo que el del adenocarcinoma endometriode convencional. Sin embargo, no muestran la tendencia a diseminarse por las superficies peritoneales como ocurre en el carcinoma seroso.

1.4.3 Carcinoma indiferenciado

El carcinoma indiferenciado de endometrio (CI), que supone entre un 1-2% de los carcinomas de endometrio, se define como una neoplasia que no presenta evidencias de diferenciación glandular ni escamosa, y con ausente o mínima diferenciación neuroendocrina (<10%). Es difícil diferenciarlo de un carcinoma endometriode grado 3, ya que éste se ha definido durante años como una neoplasia con un patrón de crecimiento sólido, ni escamoso ni glandular, en más de un 50% de su extensión. Los CI presentan frecuentemente focos rabdoides que no se suelen encontrar en los CEE, además de otras características inmunohistoquímicas, y un comportamiento extremadamente agresivo comparado con los carcinomas grado 3 (figura 3).

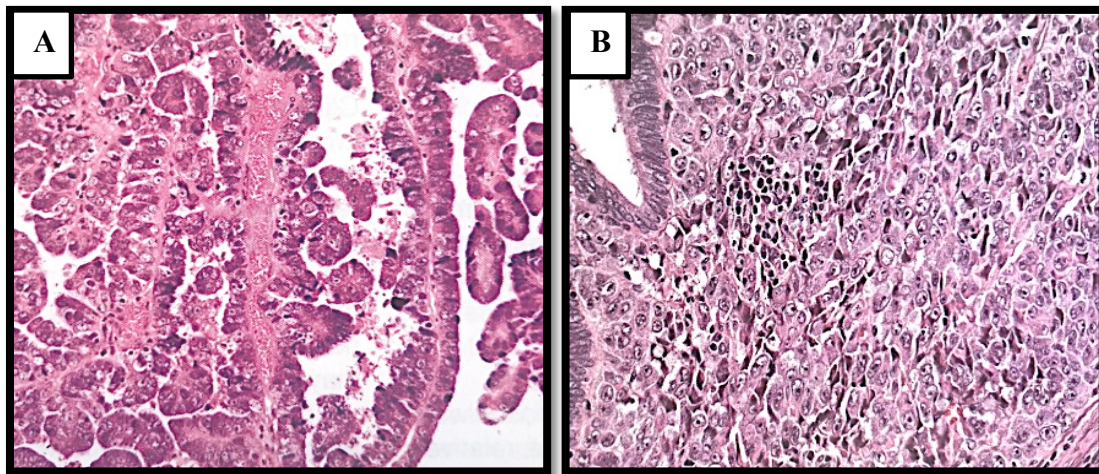


Figura 3. Ejemplo de carcinoma seroso con patrón papilar (A) y carcinoma indiferenciado (B).

1.4.4 Carcinosarcoma

Los carcinosarcomas uterinos o carcinosarcomas de endometrio (CS) previamente conocidos como tumores müllerianos mixtos malignos, son neoplasias muy poco frecuentes (<5% de los casos) que se originan principalmente en el cuerpo uterino. Tradicionalmente se han incluido entre los sarcomas, aunque en los últimos años las evidencias clínico-patológicas y biológicas han mostrado una estrecha correlación con los carcinomas de endometrio de alto grado [17, 18].

Se desarrollan principalmente en mujeres post-menopáusicas, con una edad de aparición alrededor de los 65 años, aunque muy raramente también pueden presentarse en mujeres jóvenes. La frecuencia estimada para estos tumores se sitúa en 0.6/100.000 habitantes, según el programa de vigilancia, epidemiología y resultados (*Surveillance, Epidemiology and Result Program*, <https://seer.cancer.gov>) [19]. Los factores de riesgo asociados con su desarrollo son parecidos a los que se han descrito previamente para los CE, tales como obesidad, nuliparidad y uso de estrógenos exógenos [20]. La forma más común de presentación clínica suele ser con sangrado vaginal excesivo y anormal o como identificación de una masa que protruye fuera del cérvix, debido a la naturaleza polipoide de las lesiones. Algunas pacientes debutan con una masa abdominal, dolor pélvico o alteraciones citológicas en los controles rutinarios.

Los CS se caracterizan por una tasa de supervivencia a los cinco años inferior al 35% de los casos, debido a que se normalmente se diagnostica en un estadio avanzado [21, 22]. El pronóstico en los tumores confinados al útero (Estadio I) suele ser relativamente mejor, con una tasa de supervivencia general a los cinco años alrededor del 50%, pero resulta igualmente desfavorable en comparación con el pronóstico de los CE Estadio I, cuya tasa de supervivencia general a los 5 años es superior al 80%. La afectación del sistema linfo-vascular, la infiltración del miometrio, el grado y el subtipo histológico del componente epitelial y mesenquimal resultan ser factores importantes para identificar aquellos pacientes con riesgo elevado de presentar metástasis ocultas en el momento de la detección de la neoplasia para los CS Estadio I y II [23]. Debido a estas observaciones, se propuso el uso del sistema FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) para la realización del correcto estadiaje de estos tumores [22]. En la nueva revisión de la clasificación FIGO del año 2009, los CS se separan de los otros sarcomas uterinos y se clasifican junto con los carcinomas de endometrio, al presentar los mismos factores de riesgo, síntomas clínicos parecidos, análoga sensibilidad a la quimioterapia y

semejantes perfiles inmunohistoquímicos y moleculares de distintos estudios presentes en la literatura [24-30].

Desde el punto de vista histológico, los carcinosarcomas uterinos son tumores bifásicos compuestos por una mezcla de dos componentes, uno epitelial y otro mesenquimal. Ambos elementos son malignos, fácilmente identificables y claramente delimitados aunque, en algunos casos, uno de ellos puede estar muy poco representado; por ello es recomendable realizar un muestreo exhaustivo de la pieza [31]. Los CS, en general, muestran íntima interconexión y mezcla de los dos componentes (fig. 4A), aunque en algunos casos el componente epitelial y el mesenquimal puedan aparecer claramente delimitados recordando un tumor de colisión (fig. 4B) [31].

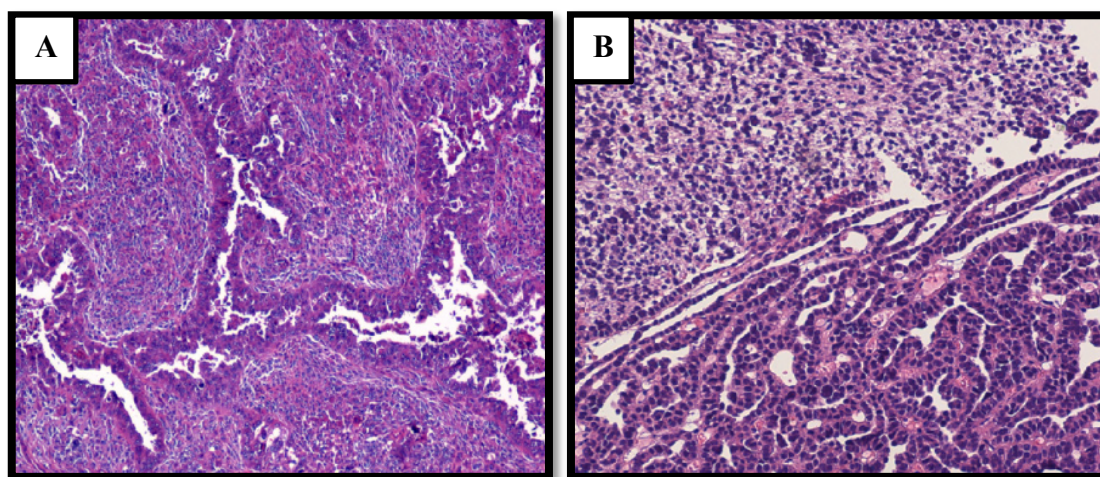


Figura 4. Ejemplo de la íntima interconexión y mezcla de los componentes epitelial y mesenquimal (A) o bien de la clara separación y delimitación de ambos (B), en función de la neoplasia [31].

El componente epitelial puede presentar diferenciación endometrioide, asociada frecuentemente con elementos escamosos, como no endometrioide, con morfologías que pueden variar desde la de carcinomas serosos, de células claras, mucinosos o indiferenciados, siendo estos dos últimos muy poco frecuentes [31]. El componente mesenquimal puede ser tanto homólogo como heterólogo. En el primer caso, normalmente puede corresponder a un sarcoma indiferenciado de alto grado, a un fibrosarcoma y, menos frecuentemente, a un leiomioma o a un sarcoma del estroma endometrial. En presencia de un componente mesenquimal heterólogo (alrededor del 50% de los casos), éste suele presentar diferenciación rhabdomioblástica o condroide, o en raras ocasiones áreas que recuerdan a los liposarcomas, osteosarcomas [32].

1.5 Inmunofenotipos y características moleculares de los CE

La distinción entre un carcinoma endometriode y un carcinoma no endometriode se realiza principalmente mediante examen histológico, aunque el diagnóstico diferencial pueda en algunos casos resultar complicado y sujeto a la variabilidad inter-observador, sobre todo en casos de neoplasias de alto grado [33]. Realizar técnicas complementarias, como la inmunohistoquímica, es parte rutinaria del proceso diagnóstico y puede ayudar a clasificar y caracterizar de forma más precisa la variante histológica de cada neoplasia.

El perfil inmunohistoquímico típico del carcinoma de endometrio suele demostrar positividad para citoqueratina 7, vimentina y antígeno de membrana epitelial (AME) y negatividad para citoqueratina 20. Los receptores de estrógeno y progesterona suelen ser positivos en la amplia mayoría de los tumores de grado I y II, mientras que en los carcinomas grado III o con características serosas, de células claras o indiferenciados la expresión baja hasta el 50% [34-38]. La sobreexpresión de la proteína p53, debida a mutaciones puntuales en el gen *TP53* y al acúmulo nuclear de la proteína mutada, se suele observar sólo en un 10-35% de los carcinomas endometrioides, principalmente los de grado III. En los casos donde se aprecie un marcaje intenso, sería aconsejable considerar el diagnóstico diferencial con un carcinoma no endometriode o indiferenciado [34, 35, 39-41].

1.5.1 Defectos en la vía de reparación del ADN

Las secuencias repetitivas del ADN, conocidas como satélites, mini-satélites y microsatélites en función de su longitud nucleotídica, están ampliamente distribuidas a lo largo de todo el genoma. Debido al hecho de ser secuencias repetidas son más susceptibles a los errores de deslizamiento o *slippage* de la ADN polimerasa durante la replicación; estos errores, si no se corrigen, pueden dar lugar en posteriores divisiones celulares a inserciones o deleciones de secuencias de nucleótidos de distinta longitud. Estos tipos de alteraciones crean mal apareamiento de bases complementarias entre las dos hebras de ADN que, en condiciones normales, se reconocen por las proteínas reparadoras de mal apareamiento de bases o *Mismatch Repair (MMR) Proteins* (fig. 5).

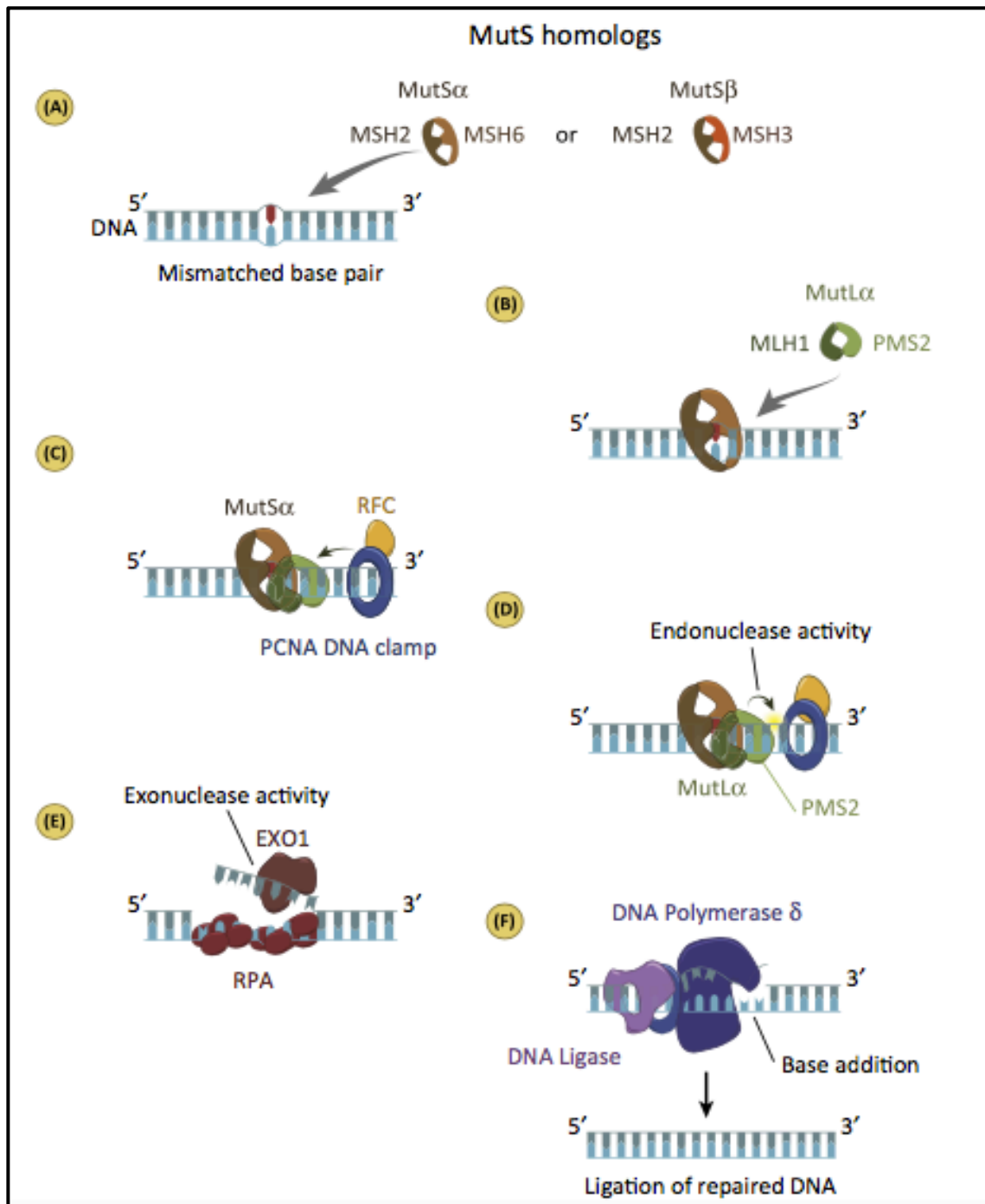


Figura 5. Mecanismo de reparación de los mal apareamientos del ADN [42].

La pérdida de algunas de las proteínas que constituyen este complejo sistema de reparación, como por ejemplo MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, da lugar a un aumento de alteraciones en las secuencias repetidas de los microsatélites a lo largo del genoma; este fenómeno se conoce como inestabilidad de microsatélites (IMS) y se considera como el sello molecular de los defectos de las proteínas reparadoras. La IMS en los carcinomas de endometrio puede depender en el 15-20% de un evento esporádico relacionado con la hipermetilación del gen *hMLH1* o bien por mutaciones puntuales en uno de los cuatro

genes *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* y *PMS2*, heredadas por vía germinal en el contexto del síndrome de Lynch.

Los estudios que han analizado la IMS en los carcinomas de endometrio esporádicos, debido a la hipermetilación del promotor del gen *hMLH1*, describen una asociación con un fenotipo endometriode en más del 95% de los casos [7, 43, 44]. La media de edad de presentación se sitúa en 66.8 años, a diferencia de la observada en los carcinomas que no presentaban MSI que es de 63.6 años. Un bajo índice de masa corporal también se ha asociado preferentemente con los tumores con IMS. Debido a estos resultados, se piensa que el hiper-estrogenismo puede jugar un papel menos importante en la carcinogénesis de los tumores con defectos en los genes MMRs.

El análisis de las alteraciones de los microsatélites se utiliza como herramienta diagnóstica, siguiendo las recomendaciones del panel Bethesda, usando preferentemente los que se localizan en las regiones genómicas no codificantes, como por ejemplo BAT25 y BAT26 [45-47]. Las mutaciones pueden involucrar microsatélites localizados en la región promotora o en regiones intrónicas de genes implicados en la progresión tumoral, como pueden ser *PTEN*, *BAX*, *IGFR2*, *TGFBR2*, *hMSH6* y *hMSH3* [48-50]. El gen *TGFBR2* contiene una secuencia microsatélite de 10 nucleótidos que se encuentra alterada frecuentemente en los cánceres colorrectales y entre un 0-24% de los carcinomas de endometrio con IMS. Mutaciones relacionadas con estas secuencias altamente repetitivas se encuentran también en un 16% de casos para el gen *BAX*, un 55% de tumores para *IGFR2*, entre un 0-14% y entre un 0-17% de muestras para *MSH3* y *MSH6* respectivamente [51-53].

Distintos estudios han analizados las características morfológicas asociadas con la condición genómica de IMS, independientemente del origen esporádico o hereditario de los tumores. Los carcinomas de endometrio IMS-positivos suelen presentar una infiltración linfocitaria peri- e intra-tumoral y algunas de estas neoplasias muestran áreas de dediferenciación [54]. La pérdida de expresión de las proteínas *MLH1* y *MSH2* suele ser una característica frecuente de los CEEs IMS-positivos y este hallazgo suele estar asociado a una hipermetilación del promotor del gen *MLH1*. Las mutaciones del gen *BRAF* son eventos infrecuentes en estos tumores a diferencia de los carcinomas colorrectales inestables.

Finalmente, la posible asociación entre la IMS y variables clínicas específicas, como grado, infiltración del miometrio, invasión linfo-vascular, estadio y pronóstico se ha investigado en distintos estudios obteniendo resultados en muchas ocasiones

contradictorios, no pudiéndose por lo tanto concluir si la presencia o ausencia de IMS pueda o no modular la respuesta al tratamiento a diferencia de lo que está pasando en los casos IMS-positivos de los carcinomas colorrectales.

1.5.2 Alteraciones en la cascada de señalización de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K)/Akt

La cascada de señalización PI3K/AKT se encuentra constitutivamente activada en los carcinomas de endometrio como consecuencia de la inactivación por mutación, pérdida de heterocigosidad o delección del gen *PTEN*, amplificación del gen *PIK3CA* y/o mutaciones puntuales en este mismo gen o en algunos de los genes que codifican para la familia de quinasas AKT.

PTEN es un gen supresor de tumores localizado en la región cromosómica 10q23.3 que juega un papel importante en la regulación del ciclo celular, apoptosis, supervivencia celular y proliferación, actuando como antagonista directo de la cascada PI3K/AKT (figura n.4). La inactivación de *PTEN* produce pérdida de su expresión proteica y se considera la alteración más frecuente de los carcinomas de endometrio siendo las mutaciones somáticas el principal evento patogénico (37-70%) [55] seguido de la pérdida de heterocigosidad o delección génica, detectada en hasta el 40% de los CEE. Estas alteraciones se han observado también en los carcinomas no endometrioides pero con frecuencias claramente inferiores (35%) [55-57]. Las mutaciones puntuales más frecuentes son sustituciones que producen un cambio de aminoácido (mutaciones con cambio de sentido o *missense*, 44% de las alteraciones), seguidas de delecciones puntuales, que alteran el marco de lectura y de las sustituciones sin sentido (*nonsense*) que producen codones de stop prematuros (24% y 14%, respectivamente). Las mutaciones se producen principalmente en el exón 5, codón 130, que codifica para el aminoácido arginina; este residuo es esencial para catalizar la defosforilación de los sustratos específicos de la proteína PTEN. Distintos estudios han evidenciado que el 60% de las mutaciones que afectan al codón 130 suelen ser sustituciones con cambio de sentido (388C>G y 389G>A), el 30% sustituciones sin sentido (388C>T) y el restante 10% delecciones puntuales del nucleótido G en la posición 389 [58-60]. Se han descrito también en la literatura mutaciones sin sentido en el exón 7, principalmente el cambio nucleotídico 697C>T en el codón 233, y en el exón 8 entre los codones 314 y 321.

Distintos estudios han descrito una mayor tasa de mutaciones del gen *PTEN* en aquellos carcinomas que presentaban defectos en el sistema de las proteínas reparadoras MMR y la presencia de Inestabilidad de Microsatélites, habiéndose detectado mutaciones en hasta el 86% de los tumores inestables comparado con el 30% de los estables [58, 60-62]. Estas mutaciones en el gen *PTEN* se han relacionado con los defectos asociados con las alteraciones en los mecanismos de reparación, ya que un amplio número de estudios han identificado en los CEE delecciones o inserciones puntuales en una pequeña secuencia mononucleotídica repetida A(6) en los exones 3 y 8, dos repeticiones (TACT/TACT y ACTT/ACTT) y una estructura palindrómica (AGTA-NN-TACT) en el exón 8 [60, 61, 63]. Otros estudios sin embargo han evidenciado que las mutaciones en el gen *PTEN* podrían preceder las alteraciones relacionadas con la pérdida de las proteínas reparadoras MMR ya que en hasta el 50% de los casos la frecuencia de mutaciones en la secuencia repetida A(6) es la misma tanto en los carcinomas con IMS como en los tumores estables [58-60, 62].

El significado pronóstico de las mutaciones en el gen *PTEN* sigue siendo contradictorio debido a que estas alteraciones se han asociado en distintos estudios a una baja tasa de recaídas y una mejor supervivencia global, junto con otras características patológicas favorables como son tumores de bajo grado sin infiltración en el miometrio. La alta incidencia de mutaciones, sin embargo, ha sido demostrada en tumores avanzados, correspondientes a neoplasias con un estadio FIGO alto, en más del 72% de los casos, así como en lesiones más indiferenciadas [60]. Otros autores han evidenciado que las mutaciones que no se producen entre los exones 5-7 podrían representar marcadores moleculares predictivos de una buena tasa de supervivencia. Por último, los tumores con mutaciones únicamente en el gen *PTEN* se han asociado con un pronóstico más favorable, en comparación con los carcinomas *PTEN* mutados e inestables diagnosticados en un estadio más avanzado de progresión tumoral [61, 64].

trabajos presentes en la literatura [55-57, 65-68]. Las mutaciones localizadas principalmente en el exón 20, se han descrito más recientemente en hasta el 38% de los carcinomas serosos de endometrio [55, 56, 66, 69, 70]. La mayoría de los estudios se han centrado en los exones 9 y 20 que codifican la porción C-terminal del dominio helicasa y quinasa de la sub-unidad p110 α [66, 67]. Los codones 542 y 545 en el exón 9 y el codón 1047 en el exón 20 representan puntos calientes (*hot spots*) del gen *PIK3CA*. Los exones 1-7, que codifican para el dominio N-terminal de la sub-unidad p110 α donde se localiza la región C2 y la región de unión para el dominio adaptador de p85 α (ABD-RBD) suelen ser puntos calientes para mutaciones puntuales con una frecuencia similar a la observada para los exones 9 y 20. Los codones más afectados por estas alteraciones suelen ser el R3, R88 y K111 en el dominio ABD y L45 y E453 en la región C2. Numerosas mutaciones se han descrito también en la sub-unidad regulatoria de PI3K en hasta un 43% de los CEE, principalmente localizadas en el dominio de iSH2 de unión de p85 α con p110 α [67]. Se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre la coexistencia de las mutaciones en los genes *PIK3CA* y *PTEN* sugiriendo un efecto aditivo entre estas alteraciones en la activación de la cascada PI3K/AKT [68, 71], a diferencia de lo que ocurre con las mutaciones en los genes *PIK3CA* y *KRAS*, que han resultado ser mutuamente excluyentes [68, 71, 72]. Finalmente, la correlación entre IMS y mutaciones en el gen que codifica para la β -catenina (*CCTNBI*) con las alteraciones en PI3K sigue siendo objeto de debate [66, 67], a pesar de los datos más recientes obtenidos de los estudios de secuenciación masiva [73].

El significado pronóstico de las mutaciones descritas en el gen *PIK3CA* sigue siendo controvertido: se ha visto que el estado mutacional del gen *PIK3R1* no tiene implicaciones pronósticas, según algunos autores [55, 67], mientras que las alteraciones en *PIK3CA* se han asociado con parámetros clínico-patológicos desfavorables como grado y estadio [71]. Estas últimas variables se han demostrado estar asociadas principalmente con el tipo de mutaciones detectadas: las que se producen en el exón 20 se han observado sobre todo en los CEE de alto grado, comparados con los de bajo grado (67% vs 33% de los casos respectivamente), mientras que las mutaciones que ocurren en el exón 9 se observan mayoritariamente en los tumores de grado 1 (hasta el 57% de los casos). Algunos trabajos han descrito la presencia de la amplificación génica de *PIK3CA* en alrededor del 10% de los casos de carcinomas de endometrio estudiados y esta alteración se ha visto estar relacionada con la edad, indicando una posible asociación entre la edad avanzada de las pacientes y el desarrollo neoplásico.

La proteína quinasa B (Protein Kinase B, PKB), también conocida como AKT, es una serina/treonina quinasa que pertenece a una familia de proteínas codificada en los humanos por 3 genes (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*) y su actividad regula diferentes procesos celulares, como supervivencia, proliferación, invasión y metabolismo. Se activan a través del reclutamiento directo en la membrana plasmática mediante la unión del dominio homólogo a Pleckstrina, PH. Las mutaciones en el dominio PH del gen *AKT1* se han identificado en el 2-14% de los CEE y parecen ser un hallazgo exclusivo de los carcinomas de tipo I [55, 56]. Distintas mutaciones se han identificado en los otros miembros de la familia AKT, como por ejemplo las que se han descrito en el dominio regulatorio C-terminal (D399N), en el dominio catalítico quinasa (R368) y en el dominio PH (D32H) del gen *AKT2* o las que se han identificado en el dominio C-terminal de *AKT3*. La mayoría de estas mutaciones se han identificado en tumores que poseían también alteraciones en el gen *PTEN* y/o *PIK3CA*. No queda claro a día de hoy el significado pronóstico de las mutaciones en los genes *AKT*, ya que dichas alteraciones se han descrito tanto en tumores de bajo grado con receptores de estrógenos positivos como en neoplasias de alto grado y estadio avanzado [74-76].

1.5.3 Alteraciones en la cascada de señalización RAS-RAF-MEK-ERK

La vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK juega un papel importante en el desarrollo y progresión de los carcinomas de endometrio (Figura n.4). La familia génica RAS consiste de 3 genes que presentan marcada homología en su secuencia génica y codifican para unas proteínas localizadas en la parte interior de la membrana plasmática que presentan actividad GTP-asa y están involucradas en distintas vías de señalización. Las mutaciones puntuales en los codones 12 y 13 del gen *KRAS* producen la pérdida de la función GTP-asa de la proteína y la activación constitutiva de la cascada de señalización mediada por ella. La frecuencia de alteraciones detectadas en los CEE varía entre 10-30% de los casos y afectan los codones 12 y 13 (70% y 30% respectivamente) [77, 78], apareciendo preferencialmente en los CEE IMS-positivos [79]. Muchos artículos evidencian una ausencia de correlación entre el grado histológico y/o el estadio de la neoplasia y la presencia de estas mutaciones, aunque las lesiones *KRAS*-positivas en estadio precoz se han asociado con un riesgo de recaída aumentado [77, 78, 80].

El gen *BRAF* codifica una tirosina-quinasa involucrada en la cascada de señalización RAS-RAF-MEK-ERK. La mutación puntual V600 de gen, descrita en otras neoplasias como el melanomas, algunos gliomas y el cáncer colorrectal, produce una

activación constitutiva de la proteína quinasa facilitando la proliferación celular de manera autónoma a través de esta cascada de señalización. Contrariamente a la alta frecuencia de mutaciones descrita en los carcinomas colorrectales, escasos estudios han evidenciado la presencia de dicha alteración en los CEE con una incidencia que suele ser baja o incluso nula [79, 81].

1.5.4 Alteraciones en la cascada de señalización del Factor de Crecimiento de los Fibroblastos (FGF)

Muchos trabajos han señalado que la cascada de señalización activada por el Factor de Crecimiento de los Fibroblastos (FGF), podría estar implicada en la patogénesis de los carcinomas de endometrio. Las mutaciones somáticas en el gen del Receptor del Factor de Crecimiento de los Fibroblastos (*FGFR2*) se han descrito en el 10-12% de los carcinomas de endometrio y, en particular, en hasta el 16% de los CEE. Estas mismas variantes se han observado en línea germinal en los síndromes asociados a craniosinostosis y displasia esquelética, principalmente las mutaciones S252W y N549K [82, 83]. Las mutaciones del gen *FGFR2* se asocian a un aumento de la activación de la cascada de señalización RAS-MAPK y resultan ser, por un lado, mutuamente excluyente con las alteraciones en el gen *KRAS* y, por otro, pueden coexistir con las mutaciones del gen *PTEN*. Los estudios que han evaluado la posible correlación entre las variables clínico-patológicas, pronóstico y la presencia de las alteraciones en el gen *FGFR2* han evidenciado que éstas eran más frecuentes en los tumores de bajo grado, aunque se asociaban con una disminución de la supervivencia libre de enfermedad [77].

1.5.5 Alteraciones en la vía de señalización WNT

La unión intercelular y a la matriz extracelular son cruciales para la regulación del crecimiento, morfogénesis y diferenciación epitelial. La primera etapa de la invasión local de las células epiteliales maduras es la pérdida de las uniones célula-célula y célula-matriz a través de la reducción de la expresión de las moléculas que mantienen las estructuras de adhesión: las proteínas de adhesión intercelular dependientes de calcio conocidas como cadherinas, así como las integrinas, que unen las células a la matriz extracelular.

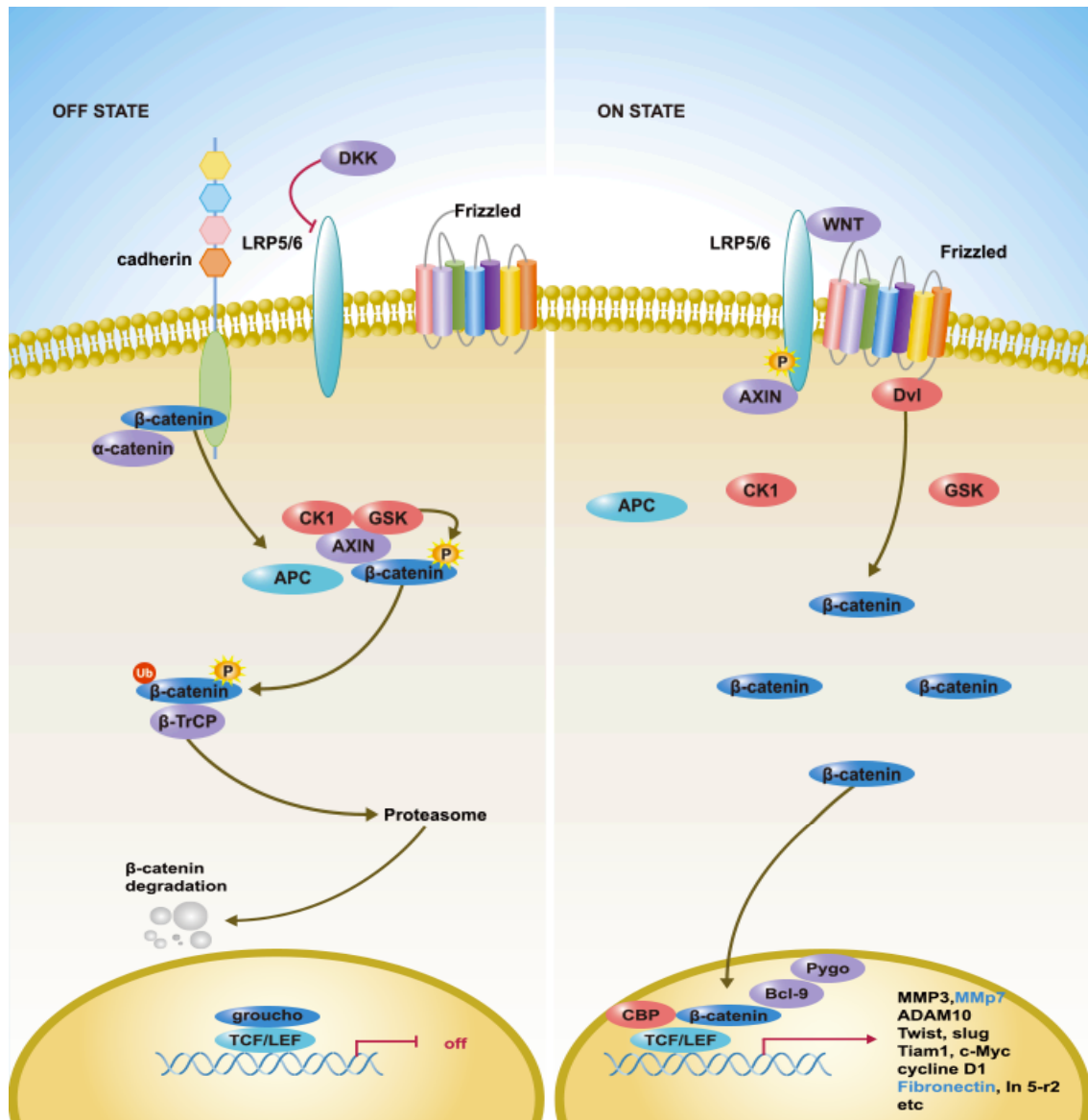


Figura 7. La vía de señalización Wnt

Las uniones adherentes tienen una acción anti-proliferativa y anti-invasiva que es mediada, al menos en parte, a través de contactos entre el extremo citoplasmático de la cadherina-E y la proteína beta-catenina. La expresión de cadherina-E se pierde en la transición adenoma-carcinoma, permitiendo la adquisición de capacidad migratoria e invasiva por parte de las células tumorales. La unión a beta-catenina es esencial para la funcionalidad de la cadherina-E y la estabilidad de las uniones adherentes en células epiteliales normales: además de unirse a cadherina-E, lo hace por otra región a la alfa-catenina, y ésta, a su vez, se une al citoesqueleto con los filamentos de actina.

Los niveles intracelulares de proteína beta-catenina están controlados de una manera estricta y compleja. En ausencia de señal en la vía Wnt, en las células epiteliales normales la beta-catenina está fundamentalmente unida a cadherina-E. La cantidad de

beta-catenina libre en el citosol es muy escasa debido a su rápida degradación. La beta-catenina no unida a cadherina-E forma complejos con la axina y el producto del gen supresor tumoral *APC* y es rápidamente fosforilada por las proteínas quinasas caseína quinasa I (CKI) y glucógeno sintasa 3-beta (GSK-3beta) y posteriormente degrada por el proteasoma (Figura 5). La unión de los factores Wnt a su complejo receptor de la membrana plasmática (Frizzled-LRP5/6) impide la fosforilación y posterior degradación de beta-catenina pudiendo entonces desplazarse hacia el núcleo y actuar como un co-activador transcripcional de la expresión génica mediante su interacción con la vía Lef-1/Tcf, activando genes involucrados en la proliferación y en el ciclo celular como *MYC*, *JUN*, *FRA-1*, *CCND1* además de proteasas (Matrilisina) y sus receptores (uPA-R) u otros genes (*CD44*, *PPAR2*, *Gastrina-E*). Como se ha comentado previamente, APC en unión con GSK-3-beta induce la fosforilación de los residuos serina-treonina codificados en el exón 3 del gen *CTNNB1* facilitando su degradación. Las mutaciones puntuales de cambio de sentido identificadas en esta región génica afectan principalmente al dominio terminal regulatorio NH2 (codones 32-45) y se han descrito casi exclusivamente en los CEE con una frecuencia que varía entre 2- 30%, en función de los estudios [62, 84, 85].

Los CEE que muestran formación de mórulas y/o diferenciación focal escamosa (84% y 45% de los casos, respectivamente) han demostrado una tendencia aumentada a acumular beta-catenina en el núcleo y una mayor frecuencia de mutaciones en el gen *CTNNB1*, evidenciando el importante papel que juega esta proteína en los cambios morfológicos de estos tumores [85]. La presencia de co-expresión de beta-catenina en el citoplasma y núcleo observada en alrededor del 30% de los CEE, sin una directa correlación con la presencia de mutaciones en el gen *CTNNB1*, indica que otras proteínas implicadas en la cascada de señalización WNT/beta-catenina/Lef-1 podrían ser las responsables de su estabilidad y de su actividad transcripcional en estas neoplasias. Los carcinomas de endometrio no suelen albergar mutaciones en el gen *APC*, aunque algunos estudios han evidenciado pérdida de heterocigosidad en su locus génico o hipermetilación de su promotor (24% y 20-45% de los casos, respectivamente), alteraciones detectadas principalmente en los carcinomas de tipo 1 [84, 86].

El significado pronóstico de las mutaciones en el gen *CTNNB1* sigue siendo controvertido, aunque se suelen asociar preferencialmente con un desarrollo precoz de las neoplasias y ausencia de metástasis linfáticas. Uno de los estudios más recientes sobre este ámbito ha observado asociación significativa entre la presencia de las mutaciones en el exón 3 del gen *CTNNB1* y el grado tumoral, siendo alrededor del 25% en los

carcinomas de grado 1 y bajando hasta un 6% en las neoplasias de grado 3. No se ha identificado otro tipo de asociación entre estas alteraciones y otras características clínico-patológicas y/o pronósticas de los pacientes.

1.5.6 Alteraciones en las ciclinas

La amplificación del gen *CCND1* se ha demostrado en el 2.1% de los CEE y en 26,3% de los CNEE con una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos [87]; un resultado parecido se obtuvo en relación con la amplificación del gen *CCNE1*, encontrándose amplificación en el 3% de los CEE frente a un 16% de CNEE (96). Un estudio reciente, usando un abordaje combinado mediante perfiles de expresión y SNP arrays para el estudio de las variantes del número de copias (Copy Number Variation, CNV) para determinadas regiones cromosómicas, ha demostrado que la amplificación de la región 3q26.32, principalmente en los tumores no endometrioides y en los de alto grado, se asocia con neoplasias con fenotipo histológico más agresivo a través de la sobreexpresión de *PIK3CA* [88-90]. Samuelson et al. [91] han estudiado dos regiones de los cromosomas 2 y 7 previamente descritas en una casuística de 13 carcinomas de endometrio advirtiendo amplificación de los genes *SDC1*, *MYCN*, *POMC*, *CDK6*, *TAC1* y *MET* en más del 50% de los tumores.

1.5.7 Alteraciones en las cadherinas

Las cadherinas son glicoproteínas transmembrana mediadoras de la adhesión célula-célula de forma homotípica (unión entre células con fenotipos similares) y dependiente del calcio. La familia de las cadherinas incluye más de 20 tipos diferentes siendo las más clásicas la cadherina-E (epitelial), la cadherina-N (neural), la cadherina-P (placentaria) y la cadherina-L (hepática). La cadherina-E y la cadherina-E participan en las uniones intercelulares de tipo adherente. Su función está, en parte, regulada por el terminal -COOH del dominio intracelular mediante cateninas de tipo alfa, beta y gamma que interactúan con elementos del citoesqueleto de las células. La integridad de este componente intracitoplásmico es esencial para una correcta adhesión celular. A diferencia de lo que ocurre con otras moléculas de adhesión (lectinas por ejemplo), las cadherinas establecen uniones celulares estables en el tiempo, jugando así un papel importante en la morfogénesis y mantenimiento de la estructura tisular, tanto en la embriogénesis como en la vida adulta. Las cadherinas epiteliales se consideran ~~como~~ elementos claves para la supresión de la progresión e invasión tumoral y en el caso de los carcinomas de

endometrio la disminución de la expresión de la cadherina-E se asocia con el subtipo histológico seroso y con los estadios avanzados. Los fundamentos moleculares de esta disminución y/o ausencia de expresión proteica sigue siendo controvertida, aunque la pérdida de heterocigosidad (*Loss Of Heterozigosity*, LOH) del gen *CDH1*, que codifica la proteína cadherina-E, se produce con mayor frecuencia en los CNEE que en los CEE (57% y 22% respectivamente) [92]. Estudios recientes también han evidenciado que algunos factores de transcripción involucrados en la transición epitelio-mesénquima son capaces de suprimir la expresión de cadherina-E. El factor ZEB1 (Proteína de dedo de zinc que se une al homeobox E-box-1) se expresa en los carcinomas de endometrio de alto grado y de tipo II [93].

1.5.8 Mutaciones en el gen ARID1A

ARID1A es un gen supresor de tumor localizado en la región cromosómica 1p36 que codifica para la proteína nuclear BAF-250. Esta proteína es uno de los componentes principales del complejo multiproteico SWI/SNF involucrado en el remodelamiento de la cromatina, proceso nuclear fundamental en el control de la expresión génica y en la regulación de distintos procesos celulares que pueden variar desde la diferenciación celular durante el desarrollo hasta la reparación del ADN [94, 95].

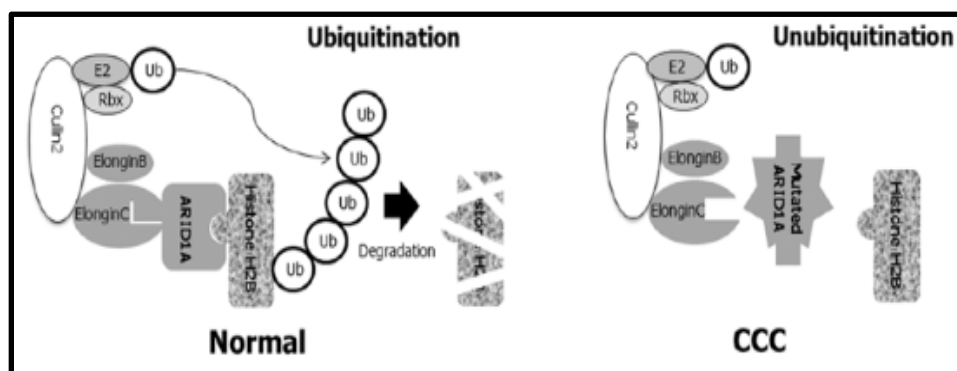


Figura 8. Actividad de la proteína codificada por ARID1A en los CCC [96].

Las mutaciones en el gen *ARID1A* se han descrito recientemente en el 46-57% de los carcinomas de células claras (CCC) de ovario, en el 40% de los carcinomas endometrioides de ovario de bajo grado y en un caso de endometriosis atípica, lesión precursora putativa de los CCC, sugiriendo que la pérdida de la función de esta proteína puede jugar un papel fundamental en el desarrollo de estas neoplasias [97, 98]. La mayoría de las mutaciones en el gen *ARID1A* son inserciones/deleciones puntuales que

introducen un codón de stop prematuro debido al corrimiento del marco de lectura y generando una proteína truncada susceptible a una prematura degradación. Distintos estudios han demostrado que la pérdida de la proteína BAF-250a se correlaciona con las mutaciones del gen *ARID1A* y los CEE de bajo grado, en los cuales se ha encontrado hasta en el 40% de los casos [98-101]. La expresión de la proteína ARID1A se ha analizado recientemente en un subgrupo de tumores de distintas localizaciones demostrando que estas alteraciones eran características principalmente de las neoplasias ginecológicas. Los CEE demuestran la frecuencia más alta de pérdida de la proteína BAF-250a, hallazgo que suele producirse en alrededor del 29% de los carcinomas de grado 1 y 2 y en el 39% de las neoplasias de grado 3 [101, 102]. Distintos estudios más recientes han evidenciado que las mutaciones en el gen *ARID1A* pueden ocurrir principalmente en concomitancia con las alteraciones en los genes *PTEN* y *PIK3CA*, sugiriendo una posible acción cooperativa de estas alteraciones en la tumorigénesis de los carcinomas de endometrio [18, 73, 103].

1.5.9 TP53

TP53 es un gen supresor de tumores capaz de inducir apoptosis o prevenir la división celular cuando se produce un daño en el ADN. Las mutaciones en este gen reducen la capacidad celular de reparar el daño en el ADN, aumentando por tanto la posibilidad de que las células vayan acumulando alteraciones genómicas transmisibles de célula a célula durante una posible expansión clonal maligna. Las mutaciones que se producen en los puntos calientes del gen *TP53* (exones 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) son las alteraciones mejor caracterizadas en el carcinoma seroso de endometrio, con más del 90% de los casos positivos [104-106]. La sobreexpresión de p53 se ha identificado en el 76% de los carcinomas serosos con una concordancia entre el estado mutacional y sobreexpresión proteica en más del 84% de las muestras [104, 107]. La presencia de mutaciones sin evidencia de expresión proteica parece indicar la ausencia o inestabilidad de la p53 debido a un producto proteico no funcional.

Las mutaciones del gen *TP53* se han observado también en los CEE, aunque con una frecuencia significativamente menor, de alrededor del 34% de los casos [108, 109]. Las alteraciones detectadas en estos casos han sido principalmente mutaciones con cambio de sentido entre los exones 4-8, que codifican para el dominio responsable de la unión de la proteína p53 con el ADN. La presencia de sobreexpresión proteica y/o de mutaciones se ha asociado con las características clínicopatológicas de estas neoplasias,

incluyendo invasión linfovascular, estadios FIGO avanzados o alto grado histológico [108] y en el pronóstico con un aumentado riesgo de recurrencia y una reducción de la supervivencia global y libre de enfermedad [109-112].

La discriminación entre carcinoma endometriode de alto grado y carcinoma seroso es un problema diagnóstico importante y frecuente. En un estudio realizado para dilucidar las posibles diferencias moleculares entre estas entidades e identificar posibles marcadores diagnósticos se ha llevado a cabo la secuenciación de 393 carcinomas de endometrio mediante la técnica del enriquecimiento del alelo diana (“target enrichment sequencing”) para las secuencias codificantes de los genes *ARID1A*, *PPP2R1A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KRAS*, *CTNNB1*, *TP53*, *BRAF* y *PPP2R5C* [70]. Cada subtipo de CE estudiado presentaba un perfil mutacional distinto y una alta frecuencia de mutaciones en los genes *PTEN*, *ARID1A* y *PIK3CA*, que en los carcinomas endometrioides de grado 3 era del 90%, 60% y 56%, respectivamente. Las mutaciones en el gen *TP53* y/o en el gen *PPP2R1A* se han identificado en el 75% de los carcinomas serosos, representando las alteraciones más frecuentes en este subtipo histológico. Una posterior revisión de los datos moleculares, en relación con el diagnóstico histológico inicial, puso en evidencia las posibles discrepancias entre el perfil mutacional y el fenotipo morfológico de los tumores. Una exhaustiva revisión a posteriori demostró que la clasificación histológica inicial era incorrecta para la mayoría de los casos estudiados [70].

Una de las principales características moleculares de los carcinomas serosos frente a los CEE es el alto nivel de inestabilidad cromosómica que se ha observado en las distintas series publicadas. Esta inestabilidad, representada por pérdida y ganancia de grandes regiones cromosómicas y de genes concretos, posiblemente se debe a las mutaciones detectadas en el gen *TP53* en los estadios más tempranos del desarrollo tumoral y se suele asociar con las amplificaciones de los genes *CCND1*, *CCNE1*, *HER2*, *MYC* y *PIK3CA* o con las deleciones de los genes *PTEN* y *CDH1*. La evidencia de estas alteraciones se ha obtenido principalmente gracias a los estudios de Hibridación Genómica Comparada (*Comparative Genomic Hybridization*, CGH).

1.5.10 El receptor de membrana HER2

La proteína HER2 es un miembro de la familia de los receptores tirosina-quinasa y su implicación en la proliferación celular se debe a su interacción con las vías de señalización PI3K/AKT y RAS/RAF/MAP quinasas. Santin et al. [113] han descrito que alrededor del 80% de los carcinomas serosos (Estadio II y III) expresan HER2 y el 42% de los casos presenta amplificación del gen *ERBB2*. Se ha demostrado que las células de este subtipo histológico de carcinomas suelen ser sensibles a la citotoxicidad inducida por el anticuerpo monoclonal trastuzumab *in vitro* y ser quimio-resistentes *in vivo* [69] sugiriendo un posible uso del fármaco Herceptin en los carcinomas serosos especialmente en aquellos casos resistentes a la quimioterapia. La sobreexpresión de la proteína HER2 se ha demostrado en el 9-30% de todos los carcinomas de endometrio, con una frecuencia muy elevada observada en los carcinomas serosos que se encuentran en estadio avanzado, con una disminución de la supervivencia general y como marcador pronóstico negativo de supervivencia libre de enfermedad [114].

1.5.11 Ploidía y alteraciones cromosómicas

La ploidía del ADN y los parámetros relacionados con ella se han utilizado en los últimos veinte años como medida e indicador de alteraciones genómicas de gran tamaño (deleciones, inserciones, amplificaciones) en el cáncer de endometrio. Existe una clara correlación entre la ploidía del ADN y los subtipos histológicos de los carcinomas endometriales: los carcinomas de endometrio de tipo I suelen ser diploides con ausencia o escasez de alteraciones cromosómicas, al contrario de los que sucede en los carcinomas serosos y de células claras que son fundamentalmente aneuploides [115, 116]. Distintos estudios han investigado el uso y significado de la ploidía del ADN como potencial biomarcador predictivo de respuesta a terapia en aquellos casos cuya progresión de la enfermedad podía resultar más difícil de predecir y para así determinar las mejores opciones de tratamiento. Este parámetro también se ha propuesto como biomarcador pronóstico en pacientes con carcinomas de endometrio. Muchos estudios han descrito una peor evolución de la enfermedad para aquellos pacientes cuyos tumores resultaron ser aneuploides aunque los análisis multivariados no han conseguido en ningún momento identificar la ploidía como parámetro predictivo independiente [117-120]. En el estudio de Pradhan et al. [118] los carcinomas endometrioides aneuploides estadio I y II fueron divididos en tres subgrupos usando como parámetro el índice del ADN (*DNA Index*, DI): 1) diploides/casi diploides/aneuploides con un $DI \leq 1.2$; 2) tumores casi

tetraploides/aneuploides con un $DI > 1.2$; 3) tumores tetraploides. Los peores resultados, en términos de tasa de recurrencia, supervivencia general y libre de enfermedad, se observaron en aquellos tumores claramente aneuploides y con un índice DI elevado. Las mejores tasas de respuesta y supervivencia se encontraron en las neoplasias que pertenecían a los grupos 1 y 3. Los pacientes con los tumores diploides presentaron la mejor tasa de supervivencia y la menor tasa de recidiva; resultados equiparables se obtuvieron para las neoplasias tetraploides.

Las alteraciones cromosómicas observadas en los CEE suelen estar principalmente relacionadas con la presencia de cariotipos híperdiploides, con una clara asociación entre el grado y la complejidad genómica, apoyando el concepto de que el fenotipo morfológico de las neoplasias se puede ver alterado por la acumulación de alteraciones moleculares numéricas [121-126]. La ganancia o trisomía parcial del cromosoma 1q es la alteración molecular descrita con mayor frecuencia, tanto en los carcinomas de tipo I como en los de tipo II, probablemente asociado con la formación de un isocromosoma $+(1)(q10)$ [123]. Las alteraciones genómicas que involucran el brazo largo del cromosoma 1 se han propuesto como eventos tempranos en la tumorigénesis de los carcinomas de endometrio, debido a que suelen ser las únicas aberraciones encontradas en la mayoría de los carcinomas de endometrio [123, 127]. La ganancia del cromosoma 10 podría también producirse en las fases iniciales del proceso neoplásico puesto que dicha alteración se ha encontrado en los distintos subgrupos de tumores basados en la condición de ploidía de los mismos. Otras anomalías cromosómicas descritas en los CEE incluyen la ganancia del cromosoma 8q y la pérdida de las regiones Xp, 9p, 9q, 17p, 19p y 19q [122, 123].

Los carcinomas no endometrioides presentan cariotipos más complejos. Junto con la ganancia del 1q, las alteraciones más frecuentes incluyen las ganancias de los cromosomas 5q, 8q y 20q [121, 123], siendo la del brazo del cromosoma 5 específica de los carcinomas serosos. Se han descrito en los CNEE también anomalías numéricas que afectan a los cromosomas 3q y 11q, regiones donde se localizan los genes *PIK3CA* y *CCND1* respectivamente [87, 90].

1.5.12 Los nuevos cuatro subgrupos moleculares

El proyecto “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA), que surgió en el año 2008 de la colaboración entre el “*National Cancer Institute*” (NCI) y el “*National Human Genome Research Institute*” (NHGRI), ha generado en los últimos años mapas integrados multidimensionales de los principales cambios genómicos de 33 tipos distintos de cánceres, entre ellos los carcinomas de endometrio. En ocasión del Simposio sobre los avances en la epidemiología y la biología de los CE celebrado en el año 2014 se presentaron los resultados del TCGA, haciendo hincapié en que la distinción actual entre carcinomas de endometrio de tipo I y II no representaba de forma exhaustiva la verdadera diversidad biológica que existía entre los distintos subgrupos histológicos [103]. A raíz de los datos publicados en el artículo del TCGA [88] se han identificado 4 nuevos subgrupos moleculares: 1) Los carcinomas “ultramutados” debido a las mutaciones en el dominio catalítico POLE de la ADN Polimerasa Epsilon. Este enzima es miembro de la familia de polimerasas presentes en los eucariotas y está constituida por cuatro subunidades: POLE, la unidad central catalítica; POLE2, POLE3 y POLE4, que constituyen respectivamente las subunidades 2, 3 y 4. Esta polimerasa juega un papel fundamental en la síntesis de la hebra principal y también sería responsable de los mecanismos de reparación basados en la escisión de bases (*Base Excision Repair*, BER). 2) El grupo de neoplasias hipermutadas caracterizadas por la Inestabilidad de los Microsatélites y los defectos en las proteínas reparadoras MMRs. Los genes afectados por las alteraciones en las proteínas reparadoras MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 difieren de los que están descritos en el cáncer colorrectal (*TGFbeta*, *IGF*, etc). El estudio del TCGA ha evidenciado algunos posibles candidatos, como por ejemplo *JAK1*, *TFAM*, *PDS5B* y *CTCF*, aunque de momento no existen datos de su importancia y relevancia clínica. El mecanismo de Inestabilidad de Microsatélites de este grupo está de todas formas principalmente relacionado con la hipermetilación del promotor del gen *MLH1* debido a que la mayoría de los casos estudiados han sido carcinomas esporádicos. Este grupo se caracteriza también por las frecuentes deleciones con cambios en el marco de lectura del gen *RPL22* y la presencia de mutaciones puntuales en los genes *KRAS* y *PTEN*; 3) Un grupo de tumores que no presenta IMS y que se caracteriza por la poca variación en el número de copias génicas (*Copy Number Variation*, CNV) y la alta frecuencia de mutaciones en el gen *CTNNB1*. 4) Los carcinomas caracterizados por un alto número de CNV, la presencia de mutaciones puntuales en los genes *TP53*, *FBXW7* y *PPP2R1A*, una baja tasa genómica de mutaciones y un pronóstico desfavorable [18, 73, 103] (Tabla n.4).

Tabla 4. Resumen de los 4 subgrupos moleculares evidenciados por el TCGA [88].

	POLE (ultramutated)	MSI (hypermutated)	Copy-number low (endometrioid)	Copy-number high (serous-like)
Copy-number aberrations	Low	Low	Low	High
MSI/MLH1 methylation	Mixed MSI high, low, stable	MSI high	MSI stable	MSI stable
Mutation rate	Very high (232×10^{-6} mutations/Mb)	High (18×10^{-6} mutations/Mb)	Low (2.9×10^{-6} mutations/Mb)	Low (2.3×10^{-6} mutations/Mb)
Genes commonly mutated (prevalence)	POLE (100%) PTEN (94%) PIK3CA (71%) PIK3R1 (65%) FBXW7 (82%) ARID1A (76%) KRAS (53%) ARID5B (47%)	PTEN (88%) RPL22 (37%) KRAS (35%) PIK3CA (54%) PIK3R1 (40%) ARID1A (37%)	PTEN (77%) CTNNB1 (52%) PIK3CA (53%) PIK3R1 (33%) ARID1A (42%)	TP53 (92%) PPP2R1A (22%) PIK3CA (47%)
Histological type	Endometrioid	Endometrioid	Endometrioid	Serous, endometrioid, and mixed serous and endometrioid
Tumour grade	Mixed (grades 1-3)	Mixed (grades 1-3)	Grades 1 and 2	Grade 3
Progression-free survival	Good	Intermediate	Intermediate	Poor

The four genomic classes were identified by The Cancer Genome Atlas Network²² by combining information on mutations, copy-number aberrations, and microsatellite instability. General characteristics of the genomic classes are shown. Mb=megabase. MSI=microsatellite instability.

La gran ventaja de esta caracterización genómica del carcinoma de endometrio es que podría permitir la introducción de nuevos marcadores moleculares o sus subrogados inmunohistoquímicos para clasificar de forma más precisa los carcinomas endometrioides y serosos y esto tendría claros beneficios de cara a decidir las mejores opciones terapéuticas. El estudio tiene también sus limitaciones ya que se ha centrado principalmente sobre los carcinomas endometrioides, serosos y mixtos por lo que la diversidad molecular de otros tumores no endometrioides como los carcinomas de células claras y los carcinosarcomas aún está por definir [73].

1.6 Características moleculares de los carcinosarcomas

Distintas hipótesis han sido propuestas para explicar la naturaleza bifásica de los carcinosarcomas uterinos durante las pasadas décadas: a) La teoría de colisión: dos tumores biclonales síncronos constituidos por células neoplásicas malignas distintas; b) La teoría de combinación: una célula neoplásica que durante su carcinogénesis haya sido capaz de diferenciarse tanto en el componente epitelial como en el mesenquimal; c) La teoría de conversión o de metaplasia monoclonal: la transformación metaplásica a partir de un único elemento celular [17, 128-131]. Los primeros estudios inmunohistoquímicos y moleculares parecieron apoyar un origen biclonal de los dos componentes, pero en la actualidad disponemos de suficiente evidencia clínica, morfológica, inmunohistoquímica y molecular para considerar a los CS como carcinomas metaplásicos cuyo componente mesenquimal mantiene ciertas características epiteliales, apoyando por lo tanto la teoría de conversión.

Los estudios de monoclonalidad se han realizado mediante micro-disección de los dos componentes y análisis por separado de la inactivación del cromosoma X, demostrando que en hasta el 85% de los casos las células de los dos componentes presentaban los mismos patrones de inactivación [31]. Ulteriores estudios basados en la determinación de las alteraciones cromosómicas, pérdida de heterocigosidad, inestabilidad de microsatélites y presencia de las mismas mutaciones de los genes *TP53* y *KRAS* en ambos elementos han aportado ulteriores evidencias científicas a favor del origen monoclonal de estos tumores [132-137]

Los datos moleculares presentes en la literatura indican en la actualidad que las alteraciones moleculares de los carcinosarcomas de endometrio se asemejan más a las que se suelen encontrar en los carcinomas no endometrioides, siendo las mutaciones y/o la sobreexpresión de p53 las alteraciones más frecuentes detectadas (hasta un 70% de los casos según las series), cuando el componente epitelial presentaba morfología análoga a un carcinoma seroso [133, 135, 138]. La sobreexpresión y/o amplificación del gen *EGFR* es otra alteración detectada en hasta el 58% de los CS según las series estudiadas y se encuentra mayormente en el componente mesenquimal [139-141]. Estudios de inestabilidad cromosómica realizados mediante hibridación genómica comparada han evidenciado que los CS suelen ser tumores altamente aneuploides, presentando distinto número de alteraciones, tales como pérdidas y/o ganancias de los brazos 8q, 17p, 17q,

11q, 15q, 20q y 21q [133, 136, 142]. La amplificación del gen *MYC* o del gen *ERBB2* (*HER2*) se han descrito también en distintas series, aunque los datos de la literatura resultan discrepantes, con frecuencias que oscilan entre 30%-87% para el gen *MYC* y un 3%-20% para el gen *HER2* respectivamente [139, 141, 142].

Los carcinosarcomas de endometrio son tumores con alta tasa de mutaciones puntuales en los mismos genes involucrados en la carcinogénesis o en la progresión tumoral de los CEE, como por ejemplo *PIK3CA*, *PTEN*, *KRAS* y *CTNNB1*. Los datos en la literatura varían según las series estudiadas, siendo las mutaciones en los genes *PIK3CA* y *KRAS* las alteraciones más comunes: las frecuencias oscilan entre 11%-32% y 5%-25% de los casos, respectivamente [139, 143, 144]. Los trabajos más recientes realizados mediante secuenciación masiva en cohortes de 20-30 muestras de carcinosarcomas de endometrio [145, 146] evidencian que la vía principalmente afectada por las mutaciones puntuales es la cascada de señalización PTEN/PI3K/AKT, alteraciones detectadas en hasta dos tercios de los casos estudiados por McConechy et al. [146]. El listado de genes que pueden albergar mutaciones puntuales en los CS ha aumentado considerablemente en los últimos 5 años y entre ellos podemos encontrar *AKT*, *NRAS*, *BRAF*, *PDGFRA*, *KIT*, *MET*, *FBXW7*, *PPP2R1A*, *ARID1A*, *ZFHX3*, *POLE*, *MLL3*, *SPOP* y *BAZ1A* [128, 139, 145, 146].

Los carcinosarcomas de endometrio se pueden considerar como buen ejemplo de ese conjunto de eventos celulares que permiten la conversión de células epiteliales a mesenquimales o con capacidad de migración y desplazamiento, proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM). Estos cambios conllevan pérdida de polarización celular y de contactos célula-célula, reorganización del citoesqueleto,—expresión de marcadores mesenquimal y, por último, adquisición de un fenotipo migratorio. La TEM se podría producir en al menos tres contextos celulares con diversas consecuencias funcionales: a) La TEM de tipo 1 se produce durante la embriogénesis, cuando un subgrupo de células epiteliales del epiblasto o de la cresta neural adquieren un fenotipo mesenquimal para generar el mesodermo y el endodermo; b) La TEM de tipo 2 se asocia al proceso de regeneración de los tejidos y la curación de las heridas; c) La TEM de tipo 3 se produce en la células de los carcinomas durante el proceso de invasión y metástasis. Este último es el proceso menos estudiado.

La TEM de tipo 3 se desencadena por la activación de distintas cascadas celulares oncogénicas que normalmente producen una sobreexpresión de los represores transcripcionales de la cadherina-E, como por ejemplo Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 y Twist

[31, 147-149]. Debido a esta pérdida progresiva de cadherina-E se produce un fenómeno conocido como cambio de cadherina que consiste en el aumento de expresión de la N-cadherina y la cadherina-11. Las células también expresan marcadores mesenquimales como la vimentina, la fibronectina, la osteonectina (SPARC) y otros [31, 149]. Hoy en día se ha evidenciado también el papel importante que juegan los micro-RNA en este tipo de transición epitelio-mesénquima. Los micro-RNA o miRNAs son una clase de RNA de pequeña longitud, 20-22 nucleótidos, que poseen un papel regulatorio importante en distintos procesos biológicos [150]. En el caso de la TEM de tipo 3 se ha visto que la familia compuesta por cinco miembros, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429, sería la responsable de mantener el fenotipo epitelial de las células inhibiendo los represores de la cadherina-E, ZEB1 y ZEB2. ZEB1 también es capaz de modular la expresión de la familia de los miR-200 indicando que este factor y los micro-RNA están involucrado en un bucle mutuamente regulatorio [148, 151].

2. OBJETIVOS

El cáncer de endometrio está representado por distintos subtipos histológicos que presentan diferente comportamiento clínico y pronóstico, entre ellos, los carcinosarcomas caracterizados por una alta tasa de recidiva y mortalidad. Los datos relacionados con las alteraciones moleculares que subyacen a este tipo de neoplasias siguen siendo escasos y principalmente centrados en las mutaciones descritas en los subtipos frecuentes y mejor conocidos. Debido a eso, en este trabajo de tesis se plantean los siguientes objetivos:

- I. Analizar las alteraciones moleculares en los carcinosarcomas de endometrio y las posibles diferencias entre el componente epitelial y mesenquimal.
- II. Analizar las posibles diferencias en las alteraciones cromosómicas dependiendo de la histología de los carcinosarcomas.
- III. Analizar las diferencias en las alteraciones moleculares entre los carcinosarcomas y otros subtipos histológicos del carcinoma de endometrio de mal pronóstico.
- IV. Analizar las posibles diferencias en el patrón de alteraciones cromosómicas en los carcinosarcomas atendiendo a la nueva clasificación molecular del carcinoma de endometrio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Población de estudio

La población de estudio se seleccionó en base al diagnóstico histológico de carcinoma endometrioide de alto grado, carcinoma seroso, carcinoma indiferenciado y carcinosarcoma (Tabla n. 5). Las muestras procedían de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla), del Hospital General de Massachusetts (Boston, MA) y del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Nueva York, NY). Las biopsias fueron seleccionadas retrospectivamente según los criterios del estudio y siguiendo los procedimientos establecidos en la ley actual de Investigación Orgánica Biomédica de 4 de julio de 2007.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de las muestras incluidas en el estudio (CS: carcinosarcoma. CNE: carcinoma seroso. CE: carcinoma endometrioide. CI: carcinoma indiferenciado).

Histología		CS	CNE	CE	CI
Nº de muestras		83	39	18	16
Edad (años)		68.86	68.34	68.13	62.1
FIGO	I-II	37	2	0	3
	III-IV	42	29	7	5
	No disponible	4	8	11	8
Componente epitelial predominante (n=76)	Endometrioide	45	-	-	-
	No Endometrioide	31	-	-	-
Componente mesenquimal predominante (n=76)	Homólogo	50	-	-	-
	Heterólogo	26	-	-	-

3.2 Estudio histológico

Los bloques de parafina se seccionaron en un *Microtomo RM2255* (Leica) a un grosor de 4 μm para la valoración histológica por hematoxilina-eosina (H-E), por parte de dos patólogos y se seleccionaron áreas tumorales representativas (>70% de células tumorales) de las que aislar cilindros con agujas de 1 mm de diámetro. Este método se utilizó para la construcción de matrices de tejido (*Tissue Micro Arrays* o TMAs) utilizadas en el análisis inmunohistoquímico y de Hibridación In Situ con Fluorescencia (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) o bien para la obtención de ácidos nucleicos en muestras de tumores que presentaban dos componentes claramente diferenciados y se consideraba a ambos objeto de estudio.

3.3 Construcción de las Matrices de Tejido

Las matrices de tejido (TMAs) se construyeron utilizando un *Manual Tissue Arrayer* (MTA; Beecher). En cada matriz se incluyeron entre 24 y 32 cilindros por duplicado, acompañados por una serie de 3-6 cilindros de casos control que incluían diferentes subtipos tumorales y tejido normal. Se hicieron secciones de 3 μm de grosor de los bloques de TMAs para su caracterización inmunohistoquímica o de FISH.



Figura 9. El equipo *Manual TissueArrayer*(MTA; Beecher) y la construcción de una matriz de tejido.

3.4 Estudio inmunohistoquímico

El estudio inmunohistoquímico fue el primer paso para la correcta caracterización de todos los grupos histológicos incluidos en esta serie [139, 148, 152].

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica y condiciones.

Marcador	Anticuerpo	Casa comercial	Recuperación antigénica	Dilución	Umbral
ARID1A	Rabbit Anti-ARID1A	Sigma	Citrato sódico	1/500	<5%
β -catenina	Mouse anti- β -Catenin	BD Biosciences	Citrato sódico	1/300	>50%
Cadherina-E	Mouse anti-E-cadherin (4A2C7)	Invitrogen	Citrato sódico	1/100	>50%
Cadherina-N	Mouse anti-N-cadherin (3B9)	ZYMED	Citrato sódico	1/50	>15%
Cadherina-P	Mouse anti-P-cadherin (56)	BD Biosciences	Citrato sódico	1/100	>15%
Ciclina D1	Rabbit monoclonal Ab to human p53	ROCHE	Citrato sódico	Pre diluido	>10%
HER2	PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Mab	ROCHE	Citrato sódico	Pre diluido	>5%
MLH1	Purified Mouse Anti-MLH1 with control	BD Biosciences	EDTA	1/10	<5%
MSH2	Anti-MSH2 (Ab-2) Mouse mAb	Calbiochem	EDTA	1/10	<5%
MSH6	Anti-MSH6 mouse IgG1	BD Biosciences	EDTA	1/40	<5%
p16	Rabbit monoclonal Ab to human p53	ROCHE	Citrato sódico	Pre diluido	>50%
p53	Rabbit monoclonal Ab to human p53	Diagnostic Biosystems	Citrato sódico	Pre diluido	>50%
PMS2	Purified Mouse Anti-PMS2	BD Biosciences	EDTA	1/10	<5%
RE	6F11mMab	Menarini	EDTA	Pre diluido	>5%
RP	PgR636mMab	DAKO	EDTA	Pre diluido	>5%

El estudio de expresión de las proteínas de interés se realizó en cortes parafinados de 3 µm de espesor mediante técnicas de inmunohistoquímica de forma automatizada utilizando: a) la plataforma *Bench Mark ULTRA®* y el kit de detección *ultra VIEW Universal DAB®* (Ventana, Medical Systems, Inc.), basado en la detección de anticuerpos primarios específicos de ratón y de conejo ligados a un antígeno en secciones de tejido embebidas en parafina. El anticuerpo específico se localiza por un cóctel de anticuerpos secundarios marcados con enzima y posteriormente el complejo formado se visualiza con un sustrato de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3, 3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) que produce un precipitado de color marrón fácilmente detectable mediante microscopía óptica; b) el sistema *PT-Link* (DAKO) para la recuperación antigénica o desenmascaramiento de los epítomos, la inmuno-tinción mediante el sistema *Autostainer Link 48* (DAKO), la inactivación de la peroxidasa endógena mediante la solución de bloqueo *EnVision FLEX ANTIBODY DILUENT* (DAKO) y por último la detección del anticuerpo utilizando el método *EnVision* (DAKO Cytomation) basado en la actividad enzimática de la peroxidasa de rábano (Tabla n. 6). El desenmascaramiento puede realizarse o bien mediante digestión enzimática con proteasa, pepsina, u otras enzimas según las especificaciones de los equipos y protocolos usados o bien mediante calor y soluciones de desenmascaramiento como citrato sódico (pH 6) o EDTA (pH 9), según las variaciones en la inmuno-reactividad dependiente del pH. Dos patólogos valoraron la presencia o ausencia de tinción de membrana, citoplasmática o nuclear en las células tumorales de cada anticuerpo, comparándolas con las del tejido sano adyacente usado como control interno de la técnica.

3.5 Estudio de las alteraciones moleculares

El estudio de las alteraciones moleculares se realizó: a) mediante extracción de ácidos nucleicos seguida de secuenciación mediante el método de Sanger o seguida de detección por espectrometría de masa para el estudio de las mutaciones puntuales; b) mediante la técnica FISH para el estudio de las alteraciones cromosómicas, tales como deleciones, ganancias, amplificaciones y aneusomías.

3.5.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN se realizó a partir de cilindros obtenidos con aguja de 1 mm de diámetro de las áreas delimitadas sobre la tinción de hematoxilina-eosina con un porcentaje de células tumorales superior al 70% y se llevó a cabo para el componente epitelial, mesenquimal y mixto de un total de 34 muestras de carcinosarcomas. El procedimiento se realizó mediante el uso del kit comercial “QIAamp DNA FFPE Tissue kit®” (QIAGEN®, Hilden, Germany) específico para material paraafinado, siguiendo los protocolos facilitados por el fabricante y mediante el extractor automático “QIAcube®” de la misma casa comercial. La concentración y calidad del ADN de todas las muestras se estimó mediante el espectrofotómetro “NanoDrop 1000” (ThermoScientific®), considerándose como adecuadas para los posteriores estudios sólo aquellas muestras con ratio 260/280 comprendido entre 1.8 y 2.

3.5.2 Estudio de las mutaciones del exón 3 del gen *CTNNB1*

El estudio de las mutaciones del exón 3 del gen *CTNNB1* mediante técnica de secuenciación directa con el método de Sanger se realizó para las 18 muestras de carcinosarcomas que presentaron expresión nuclear positiva para la β -catenina. Las secuencias de los cebadores fueron: β -Fwd (5'-ATGGAACCAGACAGAAAAGC) y β -Rev (5'-GCTACTTGTTCTGAGTGAAG). La PCR se llevó a cabo con el termociclador 9700 PCR System de Applied Biosystems® (Foster City, CA) con el siguiente programa: 15' a 95° C; 90'' a 95°, 90'' a 56° y 2' a 72° C por un total de 45 ciclos; 10' a 72°C. Los productos de amplificación de un tamaño esperado de 200 pares de bases (pb) se comprobaron mediante gel de agarosa al 2% y se purificaron posteriormente mediante el enzima ExoSAP-IT (USB Corporation, Santa Clara, CA, USA). La reacción de secuenciación automática del ADN utiliza la metodología de Sanger con una polimerasa termoestable que permite una reacción de secuenciación cíclica. El producto de la reacción se separa por electroforesis capilar. El marcaje de los fragmentos se realiza con cuatro fluorocromos (uno por cada base). Estos fluorocromos pueden estar incorporados en el cebador o *primer* ("dye primer kit"), o bien en los dideoxynucleótidos o ddNTPs o terminadores, ("dye terminator kit"). En nuestro estudio hemos utilizado el kit comercial *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems®). La PCR de secuenciación se llevó a cabo con el termociclador 9700 PCR System con el siguiente programa: 3' a 96° C; 10'' a 96°, 10'' a 50° y 4' a 60° por un total de 35 ciclos. Los

nuevos productos se purificaron mediante columna en placa de 96 pocillos y se secuenciaron mediante el secuenciador automático ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems®). Los electroferogramas obtenidos se analizaron mediante los programas SeqMan, GeneScan, Clustl X y Clustl W. La reacción de secuenciación se llevó a cabo para ambas hebras del ADN en dirección 5' y 3' para confirmar los resultados obtenidos.

3.5.3 Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH)

La reacción de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) se realizó sobre secciones de 3µm de grosor de los bloques de TMAs. Se llevó a cabo una recuperación antigénica, paso obligatorio para todas las muestras parafinadas, una digestión enzimática de las proteínas de membrana y nucleares como las histonas para permitir la correcta hibridación de las sondas fluorescente con la secuencia génica diana que se quiera estudiar, una hibridación mediada por calor durante toda la noche y una serie de lavados específicos para inactivar las sondas en exceso y eliminar posibles ruidos de fondo. El protocolo detallado consistió en: desparafinado de las muestras en estufa durante una hora a 60°C, 3 pases por xilol de 10 minutos cada uno, etanol de concentración decreciente [100% (2 x 5 min), 90% (5 min), 80% (5 min), 70% (5 min)] y un lavado final en agua destilada. El desenmascaramiento se realizó por calor en una olla a presión y citrato a pH 6. La digestión enzimática se llevó a cabo utilizando una solución con proteinasa K (200 µl) diluida en PBS (800 µl) e incubándolos cristales con en esta solución 15 min a 37°C. A continuación, se lavaron las preparaciones con SSC-2X (5 min), formaldehído (9 min) y de nuevo con SSC-2X (5 min), todo a temperatura ambiente y se dejaron secar antes de proceder a la desnaturalización e hibridación. La mezcla de las distintas sondas se preparó incluyendo 7µl de Buffer de hibridación, 2µl de H₂O y 1µl de sonda para obtener un volumen final de 10 µl. Se desnaturalizó durante 5 min a 90°C. Después se incubó en una cámara húmeda durante toda la noche a 37°C. Se realizaron los lavados post-hibridación (72°C/73°C en función de la sonda durante 2 min). Se montaron las preparaciones con 10 µl de DAPI II para poder localizar los núcleos celulares y se dejaron enfriar a -20°C durante dos horas.

Para la valoración de las preparaciones se utilizaron Microscopio Leica® con sistema de fluorescencia DM4000, los cubos de filtros DAPI, FITC, AQUA, SGold, SOrange y Texas Red, la cámara CoolCube (1m; 1360 x 1024 pixels; 6.45 µm x 6.45 µm 2/3" CCD™) y el software de imagen Isis de MetaSystems®. Se evaluaron sólo aquellas

muestras que demostraron una eficiencia de hibridación adecuada (>80% células con presencia de señal), con una morfología nuclear preservada y sin presencia de artefactos. Se evaluaron un mínimo de 50 núcleos tumorales para cada una de las muestras presentes en las matrices de tejido. Las células normales presentes se usaron como control interno de la técnica para cada una de las determinaciones. Se anotó todo tipo de alteración presente: ganancia (de 3 a 6 número de copias génicas), amplificación (ratio entre locus de interés y sonda control $\geq 2,5$), delección [ausencia de una o dos copias del gen de interés frente a la presencia de las sondas control), reordenamiento génico, aneusomías (monosomía, trisomía, polisomía).

Tabla 7. Sondas utilizadas para hibridación in situ con fluorescencia.

Alteración	Sonda	Casa comercial
ALK	Vysis ALK Break Apart	Abbott
MYCN	Vysis LSI N-MYC SpectrumGreen/CEP2 SpectrumOrange	Abbott
Chr.2		
CCND1	Vysis Melanoma	Abbott
RREB1		
MYB		
Chr.6		
EGFR	Vysis LSI N-MYC SpectrumGreen/CEP2 SpectrumOrange	Abbott
Chr.7		
MYC	XL MYC amp	MetaSystems
Chr.8		
CDKN2A	Vysis LSI CDKN2A SpectrumOrange/CEP9 SpectrumGreen	Abbott
Chr.9		
PTEN	Vysis LSI PTEN SpectrumOrange/CEP10 SpectrumGreen	Abbott
Chr.10		
TP53	ZytoLight SPEC TP53/CEN 17 Dual Color	Zytolight
Chr.17		
ERBB2	PathVysion HER-2 DNA Probe kit	Abbott
Chr.17		

3.5.4 Estudio de mutación mediante espectrometría de masa.

Se seleccionaron 34 muestras de carcinosarcomas de endometrio provenientes de los archivos del Servicios de Anatomía Patológica del Hospital General de Massachusetts (Boston, MA) en función de la disponibilidad del material tisular presente en los bloques originales y de la presencia de ambos componentes a estudiar claramente separados y

para los cuales era sencillo realizar la extracción de ácidos nucleicos mediante macrodissección. El estudio de mutación se realizó mediante el panel comercial OncoCarta™ Panel v.1.0 (Sequenom®, Hamburg, Germany) que permitió estudiar de forma simultánea un total de 238 mutaciones puntuales distribuidas en 19 genes (Tabla 9). La tecnología implementada por la empresa Sequenom® se basa en la técnica analítica de espectrometría de masa mediante el sistema de Ionización por Desorción con Láser Asistida por una Matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) y un analizador de Tiempo De Vuelo (*Time Of Flight*, TOF) junto con el sistema MassEXTEND®. El sistema MALDI se realiza mediante una radiación láser y el uso de una matriz adecuada. Se prepara mezclando una disolución de la muestra con una sustancia responsable de crear la matriz para la suspensión de las moléculas y la mezcla se deposita en un dispositivo especialmente diseñado para este sistema de ionización. Tras la evaporación del disolvente, los cristales de la mezcla muestra-matriz se irradian con un haz láser de elevada potencia y de pulsos cortos durante algunos nanosegundos que realizan la desorción e ionizan de las moléculas de la muestra y de la matriz, manteniéndolas en fase gaseosa. Se utilizan diferentes tipos de matrices dependiendo de las aplicaciones y de la naturaleza del analito (matrices orgánicas sólidas y líquidas, líquidos iónicos y materiales inorgánicos).

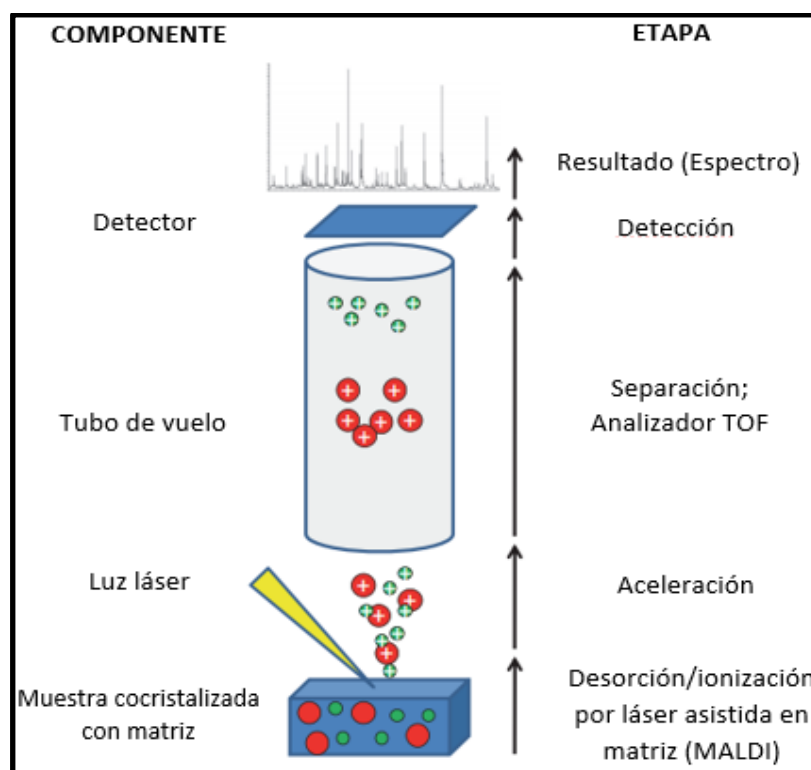


Figura 10. Esquema de la tecnología analítica de espectrometría de masa MALDI-TOF.

Las ventajas de esta técnica son la de proporcionar una alta especificidad en la determinación del peso molecular debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular, así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos de un analito. Su sensibilidad es muy elevada y en teoría permite detectar hasta una única molécula. En combinación con técnicas de separación de alta resolución es la más cualificada para analizar muestras complejas reales como es el caso de las muestras tumorales en las que se pretenden identificar mutaciones puntuales poco representadas (número de alelos mutados inferior al 1%).

Se utilizaron 16 ng de ADN para cada una de las muestras procesadas. Las reacciones de PCR-múltiple a través de 24 tubos para los cebadores específicos de la reacción de amplificación y 24 tubos para los cebadores específicos de la extensión de las cadenas en estudio, así como la preparación de la placa de 384 pocillos se realizaron siguiendo los protocolos definidos en la Guía del Usuario del *OncoCartaTM* Panel. El análisis de los resultados se realizó mediante el software MassARRAY TYPHER 4.0. Se definió como umbral de positividad sólo aquellas mutaciones que se observaron con una frecuencia > 1%.

Tabla 8. Listado de los genes y mutaciones incluidos en el *OncoCarta™ Panel*.

GENE	MUTATION
ABL1	G250E, Q252H, Y253H, Y253F, E255K, E255V, D276G, F311L, T315I, F317L, M351T, E355G, F359V, H396R
AKT1	E17K, Q43X, V167A, E319G, L357P, P388T, V461L
AKT2	S302G, R371H
BRAF	G464R, G464V/E, G466R, F468C, G469A, G469E, G469R, G469S, G469V, D594V/G, F595L, G596R, L597Q, L597R, L597S, L597V, T599I, V600E, V600K, V600L, V600R, K601N, K601E
CDK4	R24C, R24H
EGFR	R108K, T263P, A289V, G598V, E709A/G/V, E709K/H, G719A, G719S/C, E746_A750del, E746_T751del, E746_T751>A, E746_T751>S, E746_T751>V, E746_S752>V, E746_S752>D, E746_S752>A, E746_S752>I, L747S, L747_E749del, L747_A750del, L747_A750>P, L747_T751del, L747_T751>P, L747_S752del, L747_P753>Q, L747_P753>S, A750P, T751A, T751P, T751I, S752F, S752_I759del, P753Q, M766_A767insAI, S768I, V769_D770insASV, V769_D770insCV, D770_N771>AGG/N771>GF, D770_N771insG, D770_N771insGF, D770_N771insGL, D770fs*61/D770_N771insAPW, N771T, P772_H773insV, H773N, H773_V774insNPH, H773_V774insPH, H773_V774insH, V774_C775insHV, T790M, L858R, L861Q
ERBB2	L755P, A775_G776insYVMA, G776S/LC, G776VC/VC, S779_P780insVGS, P780_Y781insGSP
FGFR1	S125L, P252T
FGFR3	G370C, Y373C, A391E, K650Q/E, K650T/M
FLT3	D835H/Y, I836del
HRAS	G12V/D, G13C/R/S, Q61H/H, Q61L/R/P, Q61K
JAK2	V617F
KIT	D52N, Y503_F504insAY, K550_K558del, P551_V555del, M552L, Y553_Q556del, W557R/R/G, K558_V560del, K558_E562del, V559del, V559D/A/G, V559I, V559_V560del, V560D/G, V560del, E561K, Y568D, Y570_L576del, L576P, D579del, F584S, P585P, K642E, D816H/Y, D816V, V825A, E839K
KRAS	G12A, G12C, G12D, G12F, G12R, G12S, G12V, G13V/D, A59T, Q61E/K, Q61H/H, Q61L/R/P
MET	R970C, T992I, Y1230C, Y1235D, M1250T
NRAS	G12C/R/S, G12V/A/D, G13C/R/S, G13V/A/D, A18T, Q61E/K, Q61H, Q61L/R/P
PDGFRA	V561D, S566_E571>K, T674I, F808L, D842_H845del, D842V, I843_D846del, I843_S847>T, D846Y, N870S, D1071N
PIK3CA	R38H, R88Q, N345K, C420R, P539R, E542K, E545K, Q546K, H701P, C901F, M1043I, H1047R/L, H1047Y
RET	E632_L633del, C634R, C634W, C634Y, A664D, M918T

3.6 Análisis estadístico

El análisis se realizó con el paquete informático IBM SPSS Statistic® versión 19.0 para Windows. Se utilizaron estadísticos descriptivos para analizar las frecuencias de los datos así como la función explorar para revisar la dependencia entre variables cualitativas y cuantitativas y se aplicó el test χ^2 o el test exacto de Fisher para el estudio de asociación entre variables cualitativas. El análisis necesario para crear el mapa de calor se realizó mediante el software JMP® versión 9.0 (S.A.S. Institute).

4. RESULTADOS

4.1 Resultados I

Analizar las alteraciones moleculares en los Carcinosarcomas de Endometrio.

Nuestra población de estudio fueron los 83 Carcinosarcomas de Endometrio procedentes del Hospital General de Massachusetts (Boston, MA) y del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Nueva York, NY). Decidimos elegir este tipo de tumores debido al limitado número de estudios presentes en la literatura sobre las principales alteraciones moleculares características de esta patología, disponiendo de una serie grande y bien caracterizada histológicamente.

Las alteraciones moleculares estudiadas fueron:

- 238 mutaciones puntuales distribuidas en 19 genes.
- 11 alteraciones cromosómicas locus-específicas junto con el estudio de aneuploidía de 7 cromosomas.

4.1.1 Estudio inmunohistoquímico

El estudio inmunohistoquímico se llevó a cabo analizando 12 marcadores: ALK, BAF-250, Ciclina D1, EGFR, HER2, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, p16, p53 y β -catenina (tabla 6). Se evaluaron por separado tanto el componente epitelial como el mesenquimal de los casos presentes en las micromatrices de tejido.

La pérdida de expresión nuclear del marcador BAF-250 se utiliza como subrogado para detectar la presencia de mutaciones puntuales en el gen *ARID1A*. El 8,7% de los CS (6 de 69 casos evaluables) demostró ausencia de tinción inmunohistoquímica sin observar diferencia entre el componente epitelial y el mesenquimal.

Valoramos la sobreexpresión del marcador Ciclina D1 para estudiar la posible correlación entre presencia o ausencia de ganancia o amplificación del gen *CCND1*. El 92,7% de los casos estudiados demostró presencia de tinción nuclear para este marcador (51 de los 55 tumores evaluables).

Observamos una expresión de membrana intensa y difusa para el marcador EGFR en 54 de las 76 muestras evaluables (71% de los casos): el 24% de los tumores demostraron tinción únicamente en el componente epitelial, el 50% sólo en el componente mesenquimal y el restante 26% de casos en ambos contemporáneamente (13, 27 y 14 de las 54 muestras respectivamente).

Tabla 9. Resumen del perfil de expresión observado para cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados y su correspondiente frecuencia observada en los CS.

Marcador	Evaluación	Frecuencia	
		Epitelio	Mesénquima
ALK	No expresión	76/76 (100%)	
	Expresión	0	
BAF-250	No expresión	6/69 (8,7%)	
	Expresión	63/69 (91,3%)	
Ciclina D1	No expresión	4/55 (7,3%)	
	Expresión	51/55 (92,7%)	
EGFR	No expresión	22/76 (29%)	
	Expresión	27/54 (50%)	41/54 (76%)
HER2	No expresión	68/69 (98,5%)	
	Expresión	1/69 (1,5%)	
MLH1	No expresión	0	
	Expresión	74/74 (100%)	
MSH2	No expresión	0	
	Expresión	74/74 (100%)	
MSH6	No expresión	0	
	Expresión	74/74 (100%)	
PMS2	No expresión	0	
	Expresión	74/74 (100%)	
p16	No expresión	27/76 (35,5%)	
	Expresión	45/49 (91,8%)	44/49 (89,88)
p53	No expresión	25/76 (32,9%)	
	Expresión	51/76 (67,1%)	
β-catenina	Membrana/citoplasmática	58/76 (76,3%)	
	Nuclear	0	18/76 (23,7%)

La expresión nuclear de la proteína p16 se detectó en un total de 49 CS de los 76 evaluables: 40 de 49 muestras demostraron tinción inmunohistoquímica en ambos componentes, 5 sólo en el epitelial y 4 sólo en el mesenquimal.

Observamos sobreexpresión de p53 en el 67,1% de los tumores (51 de 76 casos evaluables) con una concordancia en el perfil de tinción observado entre los dos componentes del 97,4% de los casos. La concomitante expresión nuclear de ambas proteínas (p16 y p53) se advirtió en el 30,3% de los CS (23 de 76 muestras).

La inmunotinción nuclear para el marcador β -catenina se detectó únicamente en el componente sarcomatoso de 18 casos (23,7%). No observamos expresión del marcador ALK en ningún caso y detectamos positividad intensa de membrana de la proteína HER2 en un único caso de los 69 evaluables (1,5%)

4.1.2 Estudio mutacional

El análisis mutacional se llevó a cabo en 34 muestras de CS mediante el ensayo *OncoCartaTM* estudiándose por separado el componente epitelial y el mesenquimal en 6 de los 34 casos procesados.

Este estudio nos permitió detectar en el 44,1% de los tumores (15 de 34 CS estudiados) un total de 23 mutaciones puntuales distribuidas en 9 oncogenes; 5 de estos casos presentaron dos o más mutaciones contemporáneamente. Dos de las seis muestras, para las cuales se habían podido analizar por separado el componente epitelial y el mesenquimal, demostraron la presencia de la misma mutación en ambos componentes (figura 11C y 11D). El resumen de las alteraciones detectadas con las frecuencias observadas de los alelos mutados y nativos en cada una de ellas se detalla en la tabla n.10.

Tabla 10. Resumen de las alteraciones detectadas con las frecuencias observadas de los alelos mutados y nativos y su distribución en las 15 muestras positivas. Para las muestras MMT66 y MMT09 se analizaron por separado el componente epitelial y el mesenquimal demostrando la presencia de la misma mutación en ambos componentes.

Muestra	Gen	Cambio aminoacídico	Alelo mutado	Frec. Mutado	Frec.Nativo
MMT43	PIK3CA	E545K	A	0,414	0,586
	NRAS	G13R	G	0,404	0,596
	EGFR	N771_P772>SVDNR	GCGT	0,072	0,928
	PDGFRA	D1071N	A	0,067	0,933
MMT66	PIK3CA	E542K	A	0,445	0,555
	KRAS	G13D	T	0,39	0,61
MMT04	PIK3CA	M1043I	A	0,167	0,833
	EGFR	N771_P772>SVDNR	GCGT	0,081	0,919
MMT36	PIK3CA	E545K	A	0,171	0,829
MMT38	PIK3CA	H1047R	G	0,116	0,884
MMT50	PIK3CA	R88Q	A	0,741	0,259
MMT74	KRAS	G13D	T	0,732	0,268
	PDGFRA	D1071N	A	0,076	0,924
MMT61	KRAS	G12V	A & C	0,48	0,52
MMT52	NRAS	Q61K	T	0,403	0,597
MMT67	AKT1	rs34409589	DEL	0,776	0,224
MMT46	BRAF	G469V	T & A & C	0,268	0,682
MMT09	KIT	V559I	A	0,083	0,917
	PDGFRA	D1071N	A	0,083	0,917
	MET	R970C	T	0,061	0,939
MMT17	KIT	D52N	A	0,056	0,944
MMT49	PDGFRA	D1071N	A	0,065	0,935
MMT19	MET	T992I	T	0,437	0,563

El 32.3% de los tumores analizados (11 de 34) demostró la presencia de mutaciones en al menos uno de los genes involucrados en las vías de señalización PI3K/AKT y/o RAS/RAF. Se detectaron seis muestras con mutaciones en el gen *PIK3CA* y una con una alteración en el gen *AKT1*.

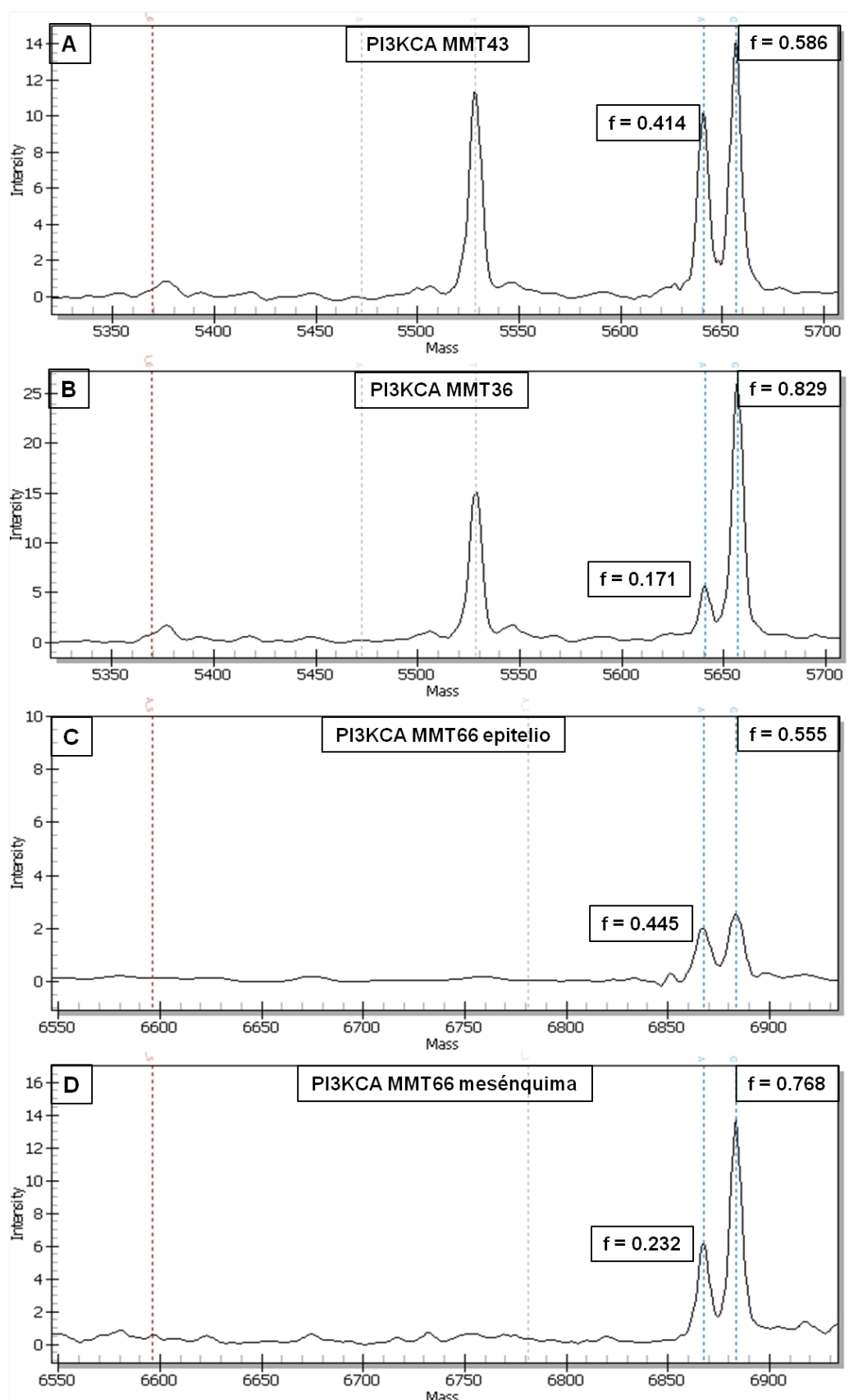


Figura 11. Los 4 gráficos representan las frecuencias de los alelos nativos (G) y mutados (A) en 3 de las 6 muestras positivas para la mutación en el gen *PIK3CA*. Los gráficos C y D representan la detección de la misma mutación en los dos componentes estudiados por separado de la muestra MMT66.

Las mutaciones detectadas en la vía RAS/RAF demostraron la siguiente distribución: tres y dos casos con mutaciones en los genes *KRAS* y *NRAS*, respectivamente, y una muestra con una alteración en el gen *BRAF*.

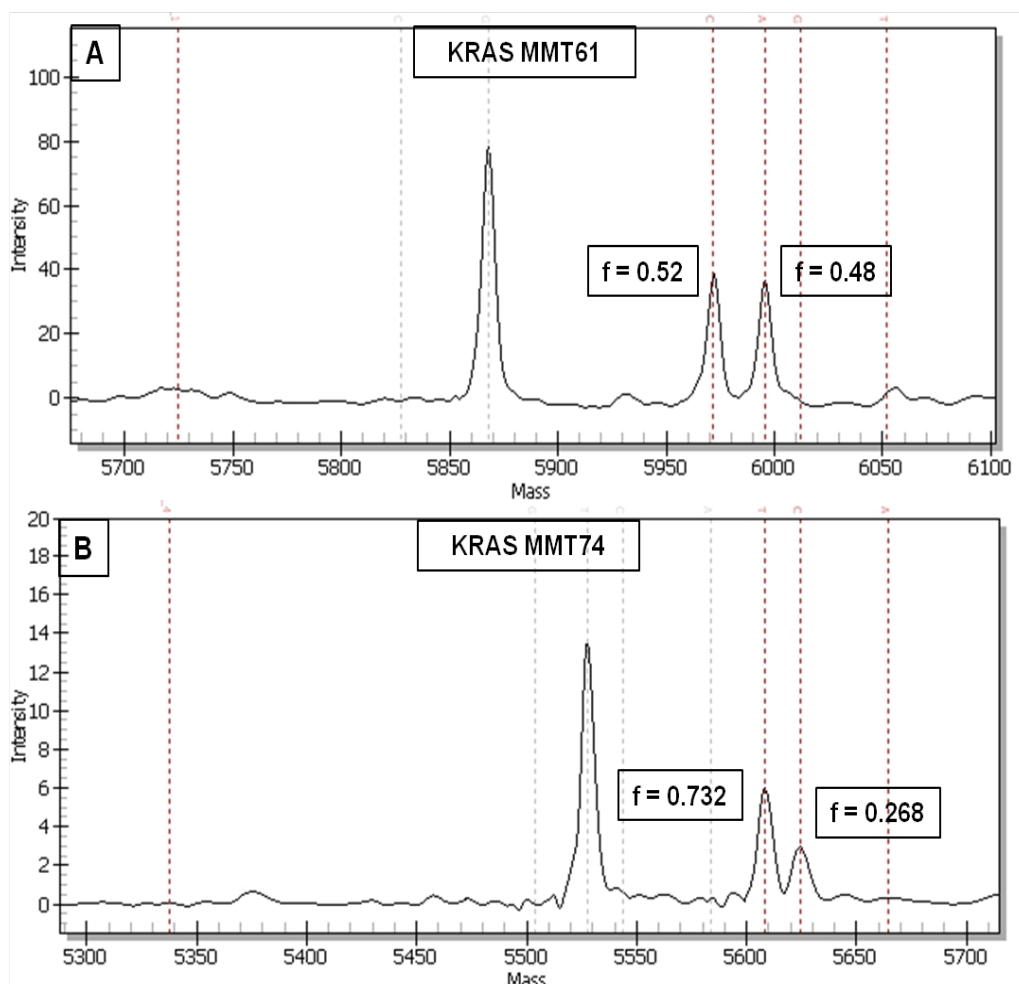


Figura 12. Los 2 gráficos representan las frecuencias de los alelos nativos (C) y mutados (A y T) detectados en las muestras MMT61 y MMT74 en el gen *KRAS*. Las dos mutaciones descritas corresponden a la G12V y a la G13D (10A y 10B respectivamente).

Las mutaciones en los genes *PDGFRα* y/o *KIT* se detectaron en el 14.7% de los CS: tres casos con alteraciones en el gen *PDGFRα*, uno con una mutación en el gen *KIT* y otro con la presencia de ambas alteraciones simultáneamente. Por último, pudimos detectar dos muestras con mutaciones en el gen *MET* y otra con una alteración en el gen *EGFR* (5.9% y 2.9% de los CS respectivamente). El resumen de las frecuencias de las mutaciones de detalla en la tabla 12.

Tabla 11. Frecuencias y distribución de las mutaciones detectadas mediante ensayo *OncoCartaTM* en nuestra serie.

Oncogenes	Nuestra serie
PIK3CA	6/34 (17%)
AKT	1/34 (2.9%)
KRAS	3/34 (8.8%)
NRAS	2/34 (5.8%)
BRAF	1/34 (2.9%)
PDGFRA	4/34 (11.7%)
KIT	2/34 (5.9%)
EGFR	2/34 (5.9%)
MET	2/34 (5.9%)
CTNNB1	0/18

Analizamos la posible asociación entre la presencia de las mutaciones en los oncogenes involucrados en las vías de señalización PI3K/AKT y RAS/RAF/ERK y las características histológicas de todas las muestras estudiadas mediante el ensayo *OncoCartaTM*. Las mutaciones en los genes de la vía PI3K/AKT estaban presentes en el 25% de los CS con un componente epitelial de tipo endometrioide y en el 14,3% de los casos con componente epitelial no-endometrioide (5 de 20 y 2 de 14 muestras respectivamente), sin poder observar una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,672$). Las alteraciones detectadas en los genes de la vía RAS/RAF/ERK estaban presentes en el 25% de los tumores con un componente epitelial endometrioide y en el 7,1% de los casos con componente epitelial no-endometrioide (5 de 20 y 1 de 14 muestras respectivamente; $p=0.364$).

Se estudió el exón 3 del gen *CTNNB1* mediante secuenciación directa bi-direccional con el método de Sanger en las 18 muestras, las cuales demostraron inmunotinción nuclear positiva de la proteína β -catenina sin encontrar mutación puntual en ninguna de ellas (figura 13).

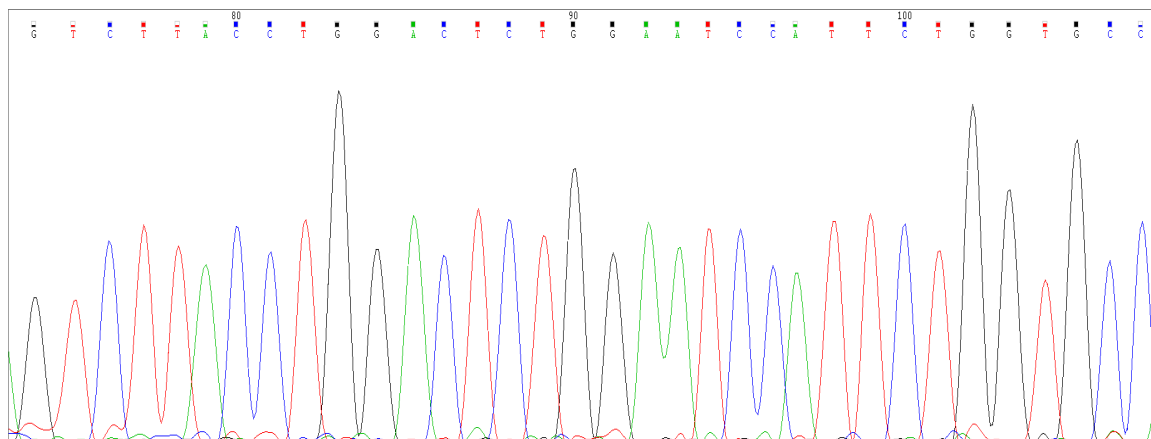


Figura 13. Electroferograma de la secuencia nativa del exón 3 del gen *CTNNB1*.

4.1.3 Estudio de las alteraciones cromosómicas

El estudio de las alteraciones cromosómicas se llevó a cabo en las 83 muestras de CS mediante técnica de *hibridación in situ con fluorescencia* (FISH), evaluando por separado el componente epitelial y el mesenquimal de los casos presentes en las micromatrices de tejido.

Se analizaron distintos tipos de alteraciones cromosómicas tanto estructurales (a) como numéricas (b):

- a) delección, ganancia y amplificación para un total de 11 genes.
- b) aneusomías (monosomía, trisomía, polisomía) para un total de 7 cromosomas.

Se excluyeron del análisis aquellas muestras (5 de 83) en las que no se pudo valorar de forma satisfactoria al menos 8 genes/cromosomas debido a ausencia de material tisular, número insuficiente de núcleos valorables o eficiencia de hibridación inferior a lo esperado.

La media de alteraciones cromosómicas observadas fue de 4.26 (SD \pm 2.64), con un valor máximo de 11 anomalías detectadas en un único caso (figura n. 14).

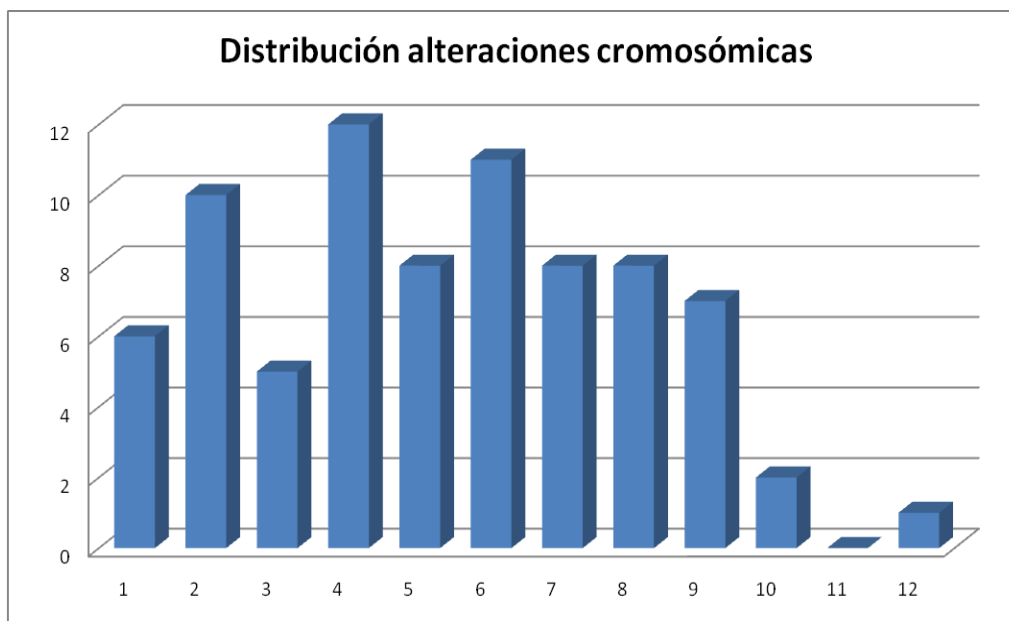


Figura 14. Frecuencia de distribución de las alteraciones cromosómicas detectadas en los CS. [Eje X= numero de alteraciones; eje Y= número de casos (N=78; Media=4.26; Desviación estándar=2.64)].

En general, según los resultados obtenidos en nuestra serie de CS, las ganancias y amplificaciones fueron las alteraciones que se detectaron principalmente para los oncogenes *ALK*, *MYCN*, *CCND1*, *EGFR* y *MYC* mientras que las deleciones fueron las principales anomalías observadas para los genes supresores de tumor *CDKN2A*, *PTEN* y *TP53*. En el caso de los genes *RREB1* y *MYB* se detectaron tanto deleciones como ganancias/amplificaciones, siendo estas últimas las más frecuentes. Dentro de la misma muestra se observaron tanto en el componente epitelial como en el mesenquimal.

Las alteraciones específicas de locus más frecuentes fueron las anomalías detectadas en los genes *MYB* y *RREB1* (76.4% y 74.5% de los casos respectivamente) seguidas de las alteraciones en los genes *PTEN*, *CDKN2A*, *TP53* y *CCND1* (49.3%, 46.7%, 42.1% y 40.4% de las muestras respectivamente). La amplificación del gen *ERBB2* no se detectó en ninguno de los tumores analizados (tabla 12).

Tabla 12. Resumen de las alteraciones detectadas por cada uno de los *loci* estudiados y su correspondiente frecuencia observada en los CS. Las anomalías están ordenadas desde las más a las menos frecuentes.

Gen	Evaluación	Frecuencia
RREB1	No alteración	14/55 (25,5%)
	Ganancia/Amplificación	29/55 (52,7%)
	Deleción	12/55 (21,8%)
MYB	No alteración	13/55 (23,6%)
	Ganancia/Amplificación	27/55 (49,1%)
	Deleción	15/55 (27,3%)
PTEN	No deleción	37/73 (50,7%)
	Deleción	36/73 (49,3%)
CDKN2A	No deleción	32/60 (53,3%)
	Deleción	28/60 (46,7%)
TP53	No deleción	33/57 (57,9%)
	Deleción	24/57 (42,1%)
CCND1	No alteración	34/57 (59,6%)
	Ganancia/Amplificación	23/57 (40,4%)
EGFR	No alteración	52/78 (66,7%)
	Ganancia/Amplificación	26/78 (33,3%)
MYCN	No alteración	54/69 (78,3%)
	Ganancia	15/69 (21,7%)
ALK	No alteración	54/69 (78,3%)
	Ganancia	15/69 (21,7%)
MYC	No amplificación	52/65 (80%)
	Amplificación	13/65 (20%)
ERBB2	No amplificación	59/59 (100%)
	Amplificación	0

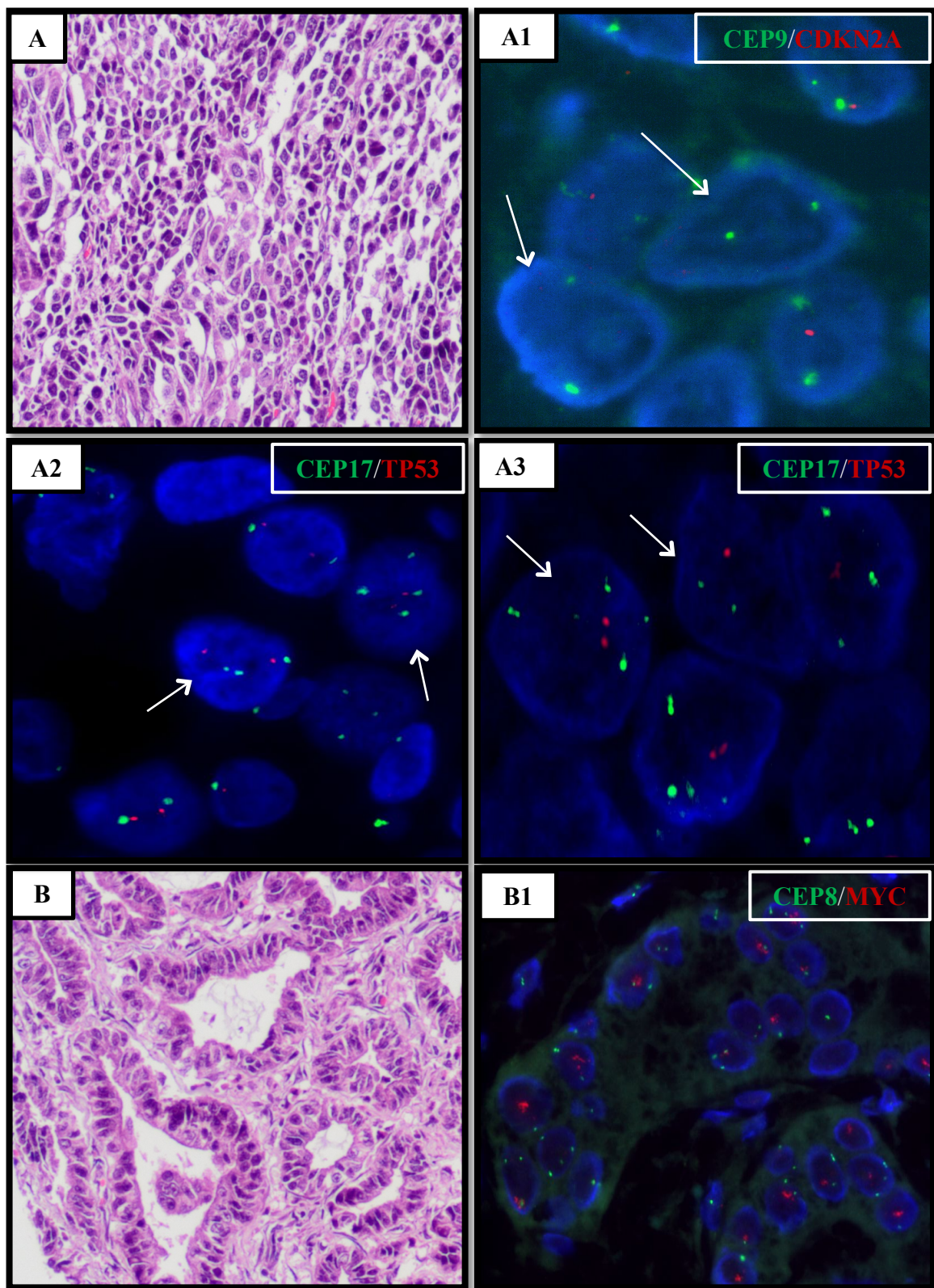


Figura 15. Ejemplos de alteraciones detectadas mediante FISH. A1) Deleción en heterocigosis y homocigosis (flechas) del gen *CDKN2A* (p16). A2-A3) Trisomía y tetrasomías del cromosoma 17 y distintos patrones de deleción del gen *TP53* (flechas). B1) Amplificación del gen *MYC*.

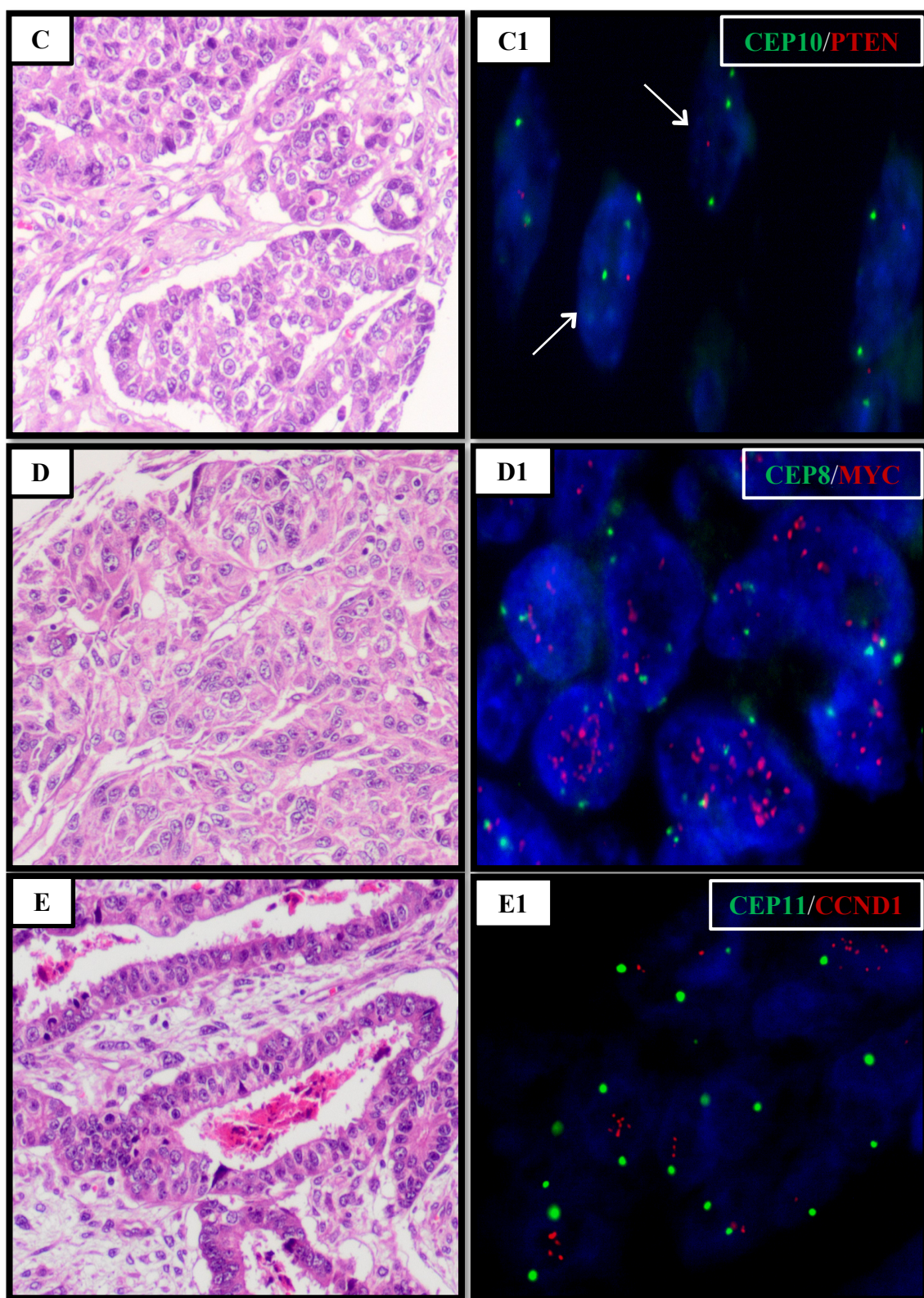


Figura 16. Ejemplos de alteraciones detectadas mediante FISH. C1) Disomía y trisomía del cromosoma 10 y pérdida de una o dos copias del gen *PTEN* (flechas). D1) Amplificación del gen *MYC* y aneusomía del cromosoma 8. E1) Amplificación del gen *CCND1*.

El 73.1% de los CS demostraron ser aneuploides (57 de 78 casos). Las alteraciones numéricas detectadas fueron principalmente las trisomías y las polisomías ($n \geq 4$). Las aneusomías del cromosoma 6 se observaron en hasta el 50% de los tumores siendo casi la mitad de ellas debidas a una monosomía del mismo (22,2% de los casos; tabla n. 13; figura 17).

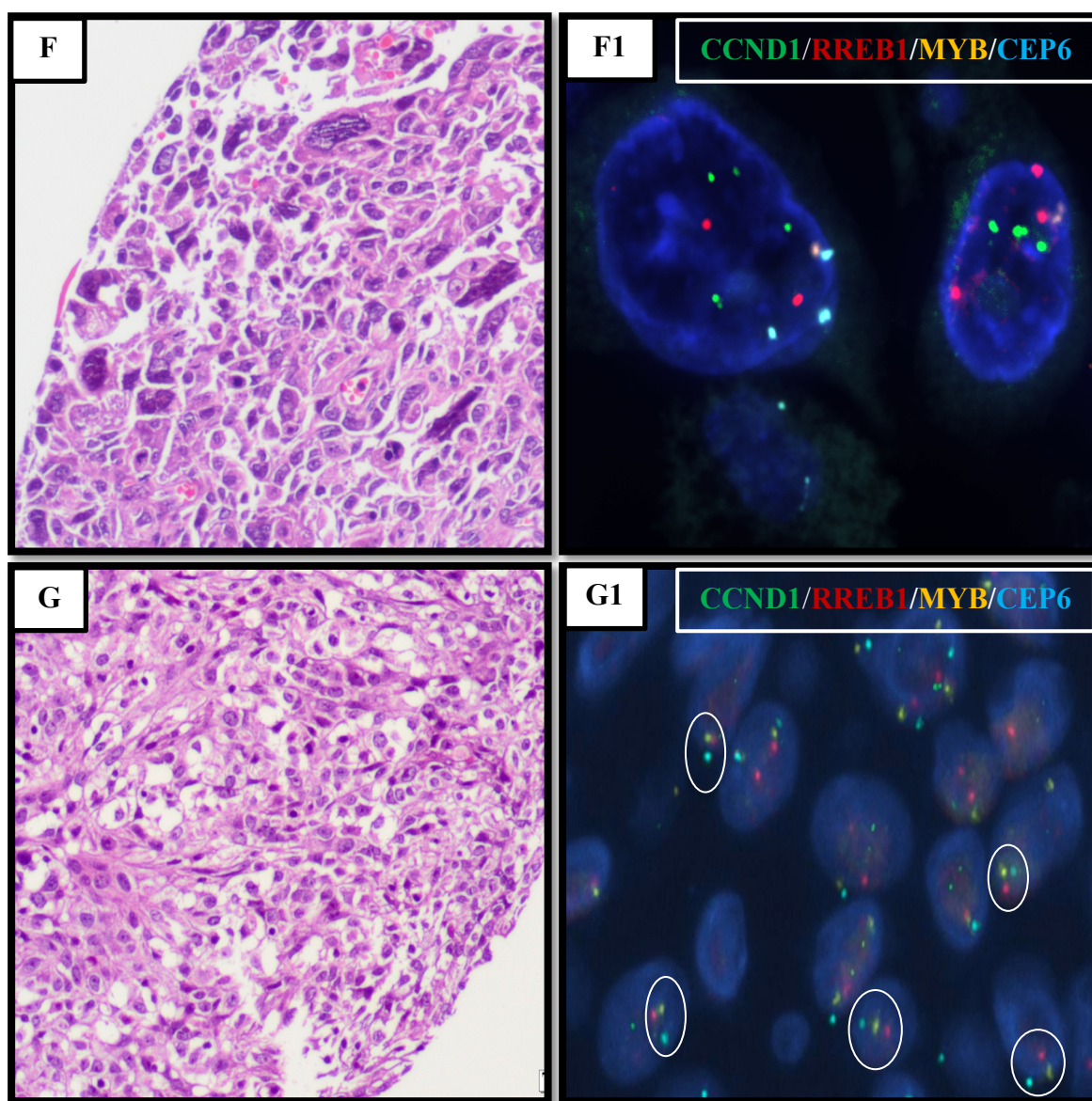


Figura 17. Ejemplos de alteraciones detectadas mediante FISH. F1) Trisomía del cromosoma 6, delección del gen MYB y ganancia del gen CCND1 (núcleo de la izquierda). E1) Monosomía del cromosoma 6 (círculos): se observa una única señal de los genes RREB1 y MYB y del centrómero del cromosoma 6.

Tabla 13. Resumen de las alteraciones detectadas por cada uno de los cromosomas estudiados y su correspondiente frecuencia observada en los CS. Las anomalías están ordenadas desde las más a las menos frecuentes.

Cromosoma	Evaluación	Frecuencia
Chr.6	Disomía	27/54 (50%)
	Polisomía	15/54 (27,8%)
	Monosomía	12/54 (22,2%)
Chr.17	Disomía	37/58 (63,8%)
	Aneusomía	21/58 (36,2%)
Chr.8	Disomía	50/68 (73,5%)
	Aneusomía	18/68 (26,5%)
Chr.7	Disomía	60/78 (76,9%)
	Aneusomía	18/78 (23,1%)
Chr.2	Disomía	54/69 (78,3%)
	Aneusomía	15/69 (21,7%)
Chr.9	Disomía	48/60 (80%)
	Aneusomía	12/60 (20%)
Chr.10	Disomía	60/73 (82,2%)
	Aneusomía	13/73 (17,8%)

La aneusomía debida a ganancia o pérdida de un único cromosoma (Chr. 6, 2, 17, 8, 9) se detectó en el 35% de los tumores aneuploides (23 de 57 casos); las alteraciones numéricas simultaneas en dos y tres cromosomas se observaron en el 26% y 22% de las muestras, respectivamente (figura n.18).

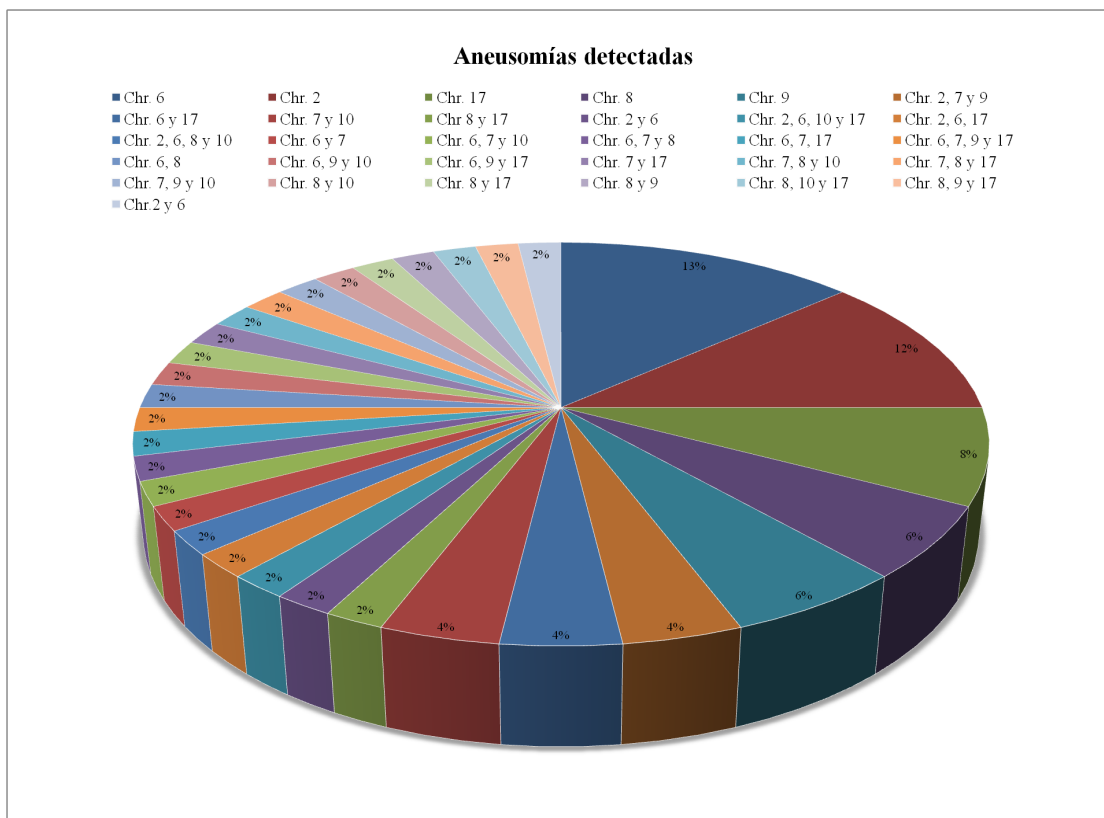


Figura 18. Las distintas combinaciones de aneusomías detectadas en nuestra serie de CS.

4.1.4 Estudio de Inestabilidad Genómica y Cromosómica

La Inestabilidad Genómica (*GIN – Genomic INstability*) es una característica común a todo tipo de cáncer y es el resultado de distintas alteraciones genéticas (mutaciones puntuales; cambios estructurales en regiones cromosómicas; alteraciones numéricas de uno o más cromosomas) que se manifiestan contemporáneamente en el mismo tumor. La Inestabilidad Cromosómica (*CIN – Chromosomal INstability*) representa la pérdida de la fidelidad de segregación de los cromosomas debido a distintos errores durante la mitosis. Uno de los principales resultados de CIN es la aneuploidía, condición asociada a pérdida o ganancia de una región génica [*sCIN -structural Chromosomal INstability*] o de uno o más cromosomas enteros [*nCIN -numerical Chromosomal INstability*] [153-155]. Disponiendo de datos sobre el conjunto de mutaciones puntuales, sobre las distintas alteraciones locus-específicas y sobre las anomalías numéricas, decidimos analizar cuantos de los casos presentes en nuestra serie de CS se podían clasificar como tumores con alta Inestabilidad Genómica y tumores con alta Inestabilidad Cromosómica.

Los resultados obtenidos mediante en el ensayo *OncoCarta™* para los quince casos que resultaron ser positivos para una o más mutaciones puntuales se analizaron junto con los datos disponibles del número de alteraciones cromosómicas presentes en los mismos. Definimos como tumores con Inestabilidad Genómica aquellas neoplasias que fuesen simultáneamente positivas para al menos una mutación puntual, una alteración estructural y una alteración numérica [156]. En base a estos criterios, 9 de los 15 casos (60%) se podrían considerar como muestras con Inestabilidad Genómica, siendo 3 de ellos tumores con un número de alteraciones superior a 5 y con aneusomía detectada en más de dos cromosomas. La muestra MMT43, que según nuestro análisis fue la que poseía el mayor número de mutaciones puntuales, demostró un bajo número de alteraciones y ausencia de aneusomía (tabla 14).

Tabla 14. Las neoplasias que fuesen contemporáneamente positivas para al menos una mutación puntual, una alteración estructural y una alteración numérica se consideraron como GIN-positivas.

Muestra	Mutaciones génicas	Alteraciones	Aneusomía	GIN
MMT43	PIK3CA, NRAS, EGFR, PDGFRA	2	No	No
MMT66	PIK3CA, KRAS	0	No	No
MMT04	PIK3CA, EGFR	4	Chr.6	SI
MMT36	PIK3CA	1	Chr. 7	SI
MMT38	PIK3CA	2	Chr. 17	SI
MMT50	PIK3CA	5	Chr. 2	SI
MMT74	KRAS, PDGFRA	3	Chr. 8	SI
MMT61	KRAS	1	No	No
MMT52	NRAS	6	Chr. 6, 7 y 8	SI
MMT67	AKT1	0	No	No
MMT46	BRAF	6	Chr. 6, 9 y 10	SI
MMT09	KIT, PDGFRA, MET	0	No	No
MMT17	KIT	5	Chr. 6, 7 y 10	SI
MMT49	PDGFRA	3	Chr. 17	SI
MMT19	MET	1	No	No

Analizamos cuantos tumores presentes de nuestra serie de CS podrían ser considerados inestables a nivel cromosómico; para ello definimos como muestras CIN-positivas aquellos casos que fuesen simultáneamente aneuploides y con un número de alteraciones superior a 3 (observamos un único caso aneuploide con dos alteraciones) y analizamos si existía correlación estadísticamente significativa entre el número de alteraciones y la condición de aneuploidía.

El 91% de las muestras aneuploides (51 de 57 casos) demostraron ser inestables a nivel cromosómico, observándose en la mayoría de ellas de 5 a 8 alteraciones numéricas y/o estructurales. El 71% de las muestras diploides (15 de 21 casos) mostraron principalmente un bajo número de anomalías, normalmente comprendidas entre 0 y 2. El análisis de la correlación entre el número de alteraciones y la condición de aneuploidía resultó estadísticamente significativo con un *p-valor* inferior a 0.001 (figura n.19).

$p < 0.001$

Figura 19. Correlación entre la aneuploidía y el número de alteraciones detectadas (Eje X= numero de alteraciones; eje Y= número de casos).

4.2 Resultados II

Analizar las posibles diferencias en las alteraciones cromosómicas dependiendo de la histología de los Carcinosarcomas.

Decidimos analizar las posibles diferencias en las alteraciones cromosómicas dependiendo de la histología predominante, tanto del componente epitelial como del mesenquimal de las 76 muestras de CS procedentes del Hospital General de Massachusetts (Boston, MA). Así mismo, también estudiamos las posibles diferencias en el tipo de alteraciones presentes en ambos componentes.

Para el componente epitelial se definieron dos tipos de histologías: a) Endometrioide, que comprendía la diferenciación endometrioide propiamente dicha, la endometrioide con diferenciación escamosa y la escamosa; esta morfología se observó en el 59% de los CS (45 de 76 casos); b) No Endometrioide, para las diferenciaciones Serosa, de Células Claras e Indiferenciada observadas en las 31 muestras restantes (41% de los casos).

Igualmente, para el componente mesenquimal se definieron dos tipos de histologías: a) Homólogo, observado en 50 de los 76 CS (65.8% de los casos; b) Heterólogo, que comprendía las diferenciaciones Condroides, Osteoides y Rabdoide de los restantes 26 casos (34.2% de las muestras), como se puede observar en la figura n.20.

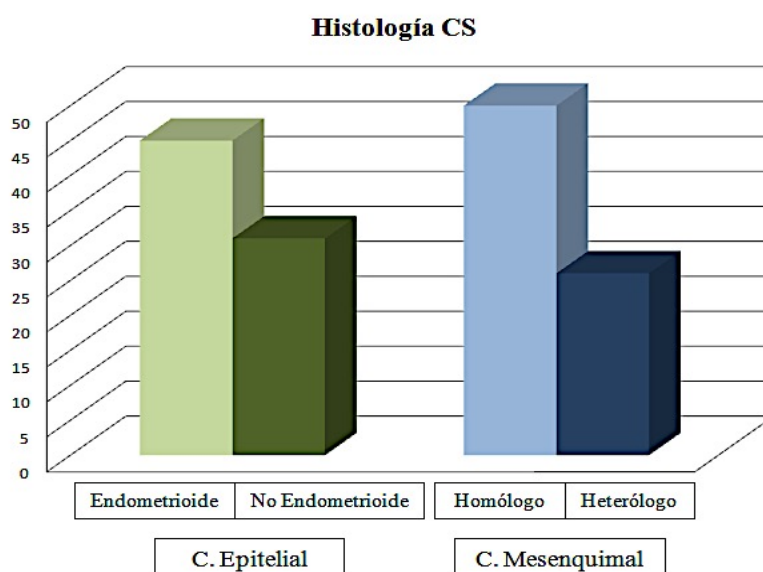


Figura 20. Distribución de los casos con diferenciación Endometrioide/No Endometrioide y Homóloga/Heteróloga para el componente epitelial y mesenquimal respectivamente (eje Y= nº de casos).

Todas las alteraciones estudiadas mediante hibridación *in situ* con fluorescencia se evaluaron por separado tanto en el componente epitelial como en el componente mesenquimal, sin observarse diferencias en las alteraciones estructurales y numéricas dentro del mismo tumor: tanto el componente epitelial como el mesenquimal mostraron el mismo nivel de aneuploidía y/o de deleciones y ganancias. Observamos grados distintos de heterogeneidad intratumoral que iban aumentando en función de que la muestra fuera aneuploide y de que presentara un elevado número de alteraciones totales, hallazgos acordes a lo esperado para aquellos tumores que hemos definido en el anterior apartado como inestables a nivel cromosómico.

Analizamos posteriormente si existían diferencias estadísticamente significativas entre las anomalías detectadas en el componente epitelial con diferenciación Endometrioide versus No Endometrioide. Observamos que las ganancias de los genes *ALK* y *MYCN* junto con la aneusomía del cromosoma 2 estaban presentes en el 34,6% de los casos (9 de 26) con diferenciación No Endometrioide frente al 13,2% de las muestras (5 de 38) con fenotipo Endometrioide. La diferencia observada demostró ser estadísticamente significativa con un *p-valor* igual a 0,042.

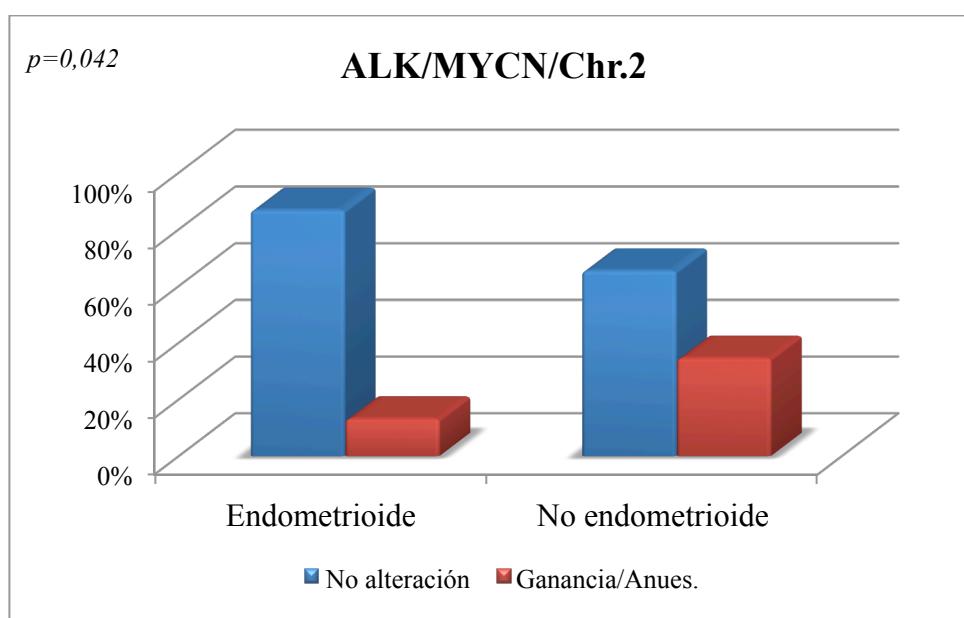


Figura 21. Distribución de la ganancia de los genes *ALK* y *MYCN* y de la aneusomía de cromosoma 2 en las muestras con componente epitelial de tipo endometrioide y no endometrioide.

Los dos genes *ALK* y *MYCN* se localizan en el brazo p del cromosoma 2, en las regiones 2p23.2 y 2p24.3, respectivamente. Debido a los resultados obtenidos (mismos casos con alteraciones y, por lo tanto, misma frecuencia), es razonable pensar que las ganancias observadas para ambos estén relacionadas con la aneusomía del cromosoma 2 (trisomía y polisomía).

La ganancia y/o amplificación del gen *CCND1* fue la otra alteración estructural que observamos hasta en el 60% de los tumores (12 de 20) en el componente epitelial con diferenciación No Endometriode, frente a un 29% de los casos con morfología Endometriode (9 de 31). La diferencia obtenida también resultó ser estadísticamente significativa con un *p-valor* igual a 0.029 (figura 22).

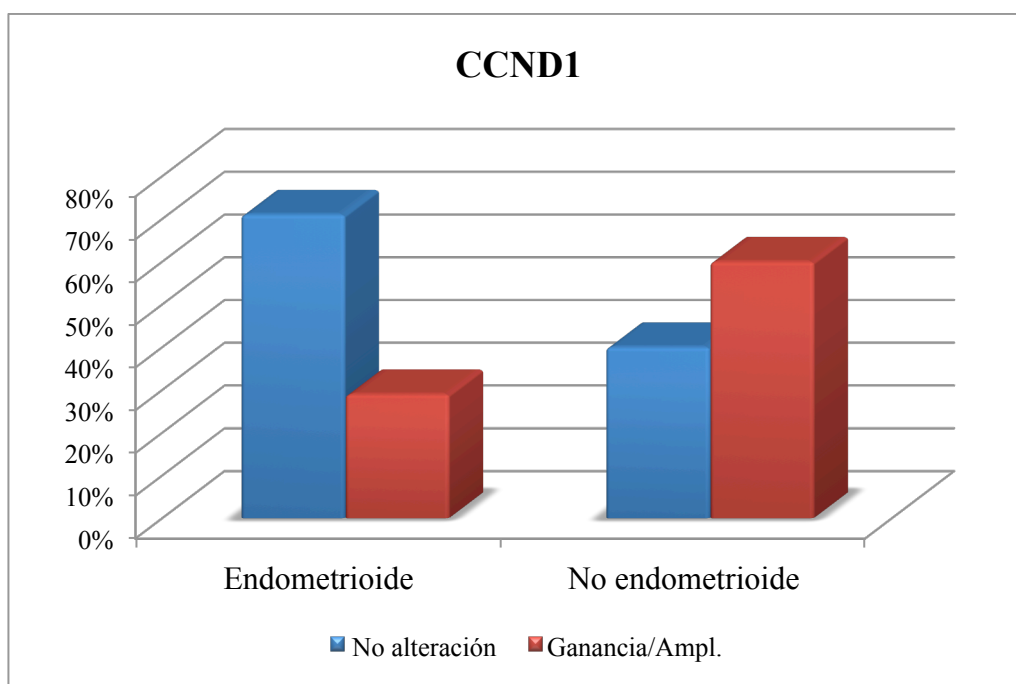


Figura 22. Distribución de la ganancia/amplificación del gen *CCND1* en las muestras con componente epitelial de tipo endometriode y no endometriode.

Analizamos si existían diferencias entre las anomalías detectadas en el componente mesenquimal con diferenciación Homóloga versus la Heteróloga. No observamos ninguna alteración predominante en uno de los dos subtipos morfológicos (tabla 15a y 15b).

Tabla 15a. Resultados obtenidos para cada uno de los genes y cromosomas estudiados en el componente epitelial y mesenquimal en función de la diferenciación histológica observada.

Gen/Chr.	Evaluación	Epitelio		<i>p</i> -valor	Mesénquima		<i>p</i> -valor
		End.	No End.		Hom.	Het.	
ALK	No alteración	33/38 86,8%	17/26 65,4%	p=0,042	36/45 80%	14/19 73,7%	NS
	Ganancia	5/38 13,2%	9/26 34,6%		9/45 20%	5/19 26,3%	
MYCN	No alteración	33/38 86,8%	17/26 65,4%	p=0,042	36/45 80%	14/19 73,7%	NS
	Ganancia	5/38 13,2%	9/26 34,6%		9/45 20%	5/19 26,3%	
Chr.2	Disomía	33/38 86,8%	17/26 65,4%	p=0,042	36/45 80%	14/19 73,7%	NS
	Aneusomía	5/38 13,2%	9/26 34,6%		9/45 20%	5/19 26,3%	
CCND1	No alteración	22/31 71%	8/20 40%	p=0,029	20/33 60,6%	10/18 55,6%	NS
	Ganancia/Ampl.	9/31 29%	12/20 60%		13/33 39,4%	8/18 44,4%	
RREB1	No alteración	9/31 29%	3/19 18,8%	NS	7/33 21,2%	5/17 29,4%	NS
	Ganancia/Ampl.	14/31 45,2%	12/19 63,2%		17/33 51,5%	9/17 52,9%	
	Deleción	8/31 25,8%	4/19 21,1%		9/33 27,3%	3/17 17,6%	
MYB	No alteración	10/31 32,3%	2/19 10,5%	NS	7/33 21,2%	5/17 29,4%	NS
	Ganancia/Ampl.	12/31 38,7%	11/19 57,9%		15/33 45,5%	8/17 47,1%	
	Deleción	9/31 29%	6/19 31,6%		11/33 33,3%	4/17 23,5%	
Chr.6	Disomía/Polis.	23/31 74,2%	15/19 78,9%	NS	24/33 72,7%	14/17 82,4%	NS
	Monosomía	8/31 25,8%	4/19 21,1%		9/33 27,3%	3/17 17,6%	
EGFR	No alteración	31/43 72,1%	20/30 66,7%	NS	36/48 75%	15/25 60%	NS
	Ganancia/Ampl.	12/43 27,9%	10/30 33,3%		12/48 25%	10/25 40%	
Chr.7	Disomía	35/43 81,4%	24/31 77,4%	NS	40/49 81,6%	19/25 76%	NS
	Aneusomía	8/43 18,6%	7/31 22,6%		9/49 18,4%	6/25 24%	

Tabla 15b. Resultados obtenidos para cada uno de los genes y cromosomas estudiados en el componente epitelial y mesenquimal en función de la diferenciación histológica observada.

Gen/Chr.	Evaluación	Epitelio		p-valor	Mesénquima		p-valor
		End.	No End.		Hom.	Het.	
MYC	No amplificación	28/36 77,8%	19/23 82,6%	NS	32/39 82,1%	15/20 75%	NS
	Amplificación	8/36 22,2%	4/23 17,4%		7/39 17,9%	5/20 25%	
Chr.8	Disomía	27/37 73%	20/25 80%	NS	30/40 75%	17/22 77,3%	NS
	Aneusomía	10/37 27%	5/25 20%		10/40 25%	5/22 22,7%	
CDKN2A	No delección	17/33 51,5%	12/24 50%	NS	21/39 53,8%	8/18 44,4%	NS
	Delección	16/33 48,5%	12/24 50%		18/39 46,2%	10/18 55,6%	
Chr.9	Disomía	28/33 84,8%	17/24 70,8%	NS	32/39 82,1%	13/18 72,2%	NS
	Aneusomía	5/33 15,2%	7/24 29,2%		7/39 17,9%	5/18 27,8%	
PTEN	No delección	19/40 47,5%	13/27 48,1%	NS	24/44 54,5%	8/23 34,8%	NS
	Delección	21/40 52,5%	14/27 51,9%		20/44 45,5%	15/23 65,2%	
Chr.10	Disomía	32/40 80%	25/27 92,6%	NS	39/44 88,6%	18/23 78,3%	NS
	Aneusomía	8/40 20%	2/27 7,4%		5/44 11,4%	5/23 21,7%	
ERBB2	No amplificación	33/33 100%	20/20 100%	NS	33/33 100%	20/20 100%	NS
	Amplificación	0	0		0	0	
TP53	No delección	19/31 61,3%	10/20 50%	NS	20/32 62,5%	9/19 47,4%	NS
	Delección	12/31 38,7%	10/20 50%		12/32 37,5%	10/19 52,6%	
Chr.17	Disomía	23/31 74,2%	10/20 50%	NS	22/32 68,8%	11/19 57,9%	NS
	Aneusomía	8/31 25,8%	10/20 50%		10/32 31,3%	8/19 42,1%	

Nuestros resultados, por tanto, evidencian que, a excepción de las anomalías estructurales del gen *CCND1* y las numéricas relacionadas con el cromosoma 2, no existen diferencias significativas en las alteraciones cromosómicas dependiendo de la histología de los Carcinosarcomas.

4.3 Resultados III

Analizar las diferencias en las alteraciones moleculares entre los carcinosarcomas y otros subtipos histológicos del carcinoma de endometrio de mal pronóstico.

Nos propusimos averiguar si los CS presentaban características moleculares específicas que los pudiesen distinguir del resto de tumores endometriales, ya que algunas de las alteraciones estudiadas en nuestra serie son eventos moleculares que subyacen en otros tipos de carcinomas de endometrio. Por esta razón, elegimos una serie de 73 carcinomas de endometrio de alto grado, constituida por 39 carcinomas serosos (CNE), 18 carcinomas endometrioides grado 3 (CE) y 16 carcinomas indiferenciados (CI) como se describe en la Tabla 5 (M&M).

Se analizaron los distintos tipos de alteraciones cromosómicas, tanto estructurales (a) como numéricas (b), estudiadas en los CS (deleciones, ganancias, amplificaciones y aneusomías) para un total de 11 genes y 7 cromosomas. Se excluyeron del análisis cuatro muestras (1 CNE, 1 CE y 2 CI) en las que no se pudo valorar de forma satisfactoria al menos 8 genes/cromosomas, debido a la ausencia de material tisular, número insuficiente de núcleos evaluables o eficiencia de hibridación inferior a lo esperado.

Se estudió también la expresión de 4 marcadores inmunohistoquímicos: ciclina D1, BAF-250, MLH1 y MSH2. La ciclina D1 se analizó para averiguar si existía una posible correlación entre la ganancia/amplificación génica detectada en algunos tumores y su posible sobreexpresión nuclear. BAF-250 se estudió como subrogado inmunohistoquímico de la presencia o ausencia de mutaciones puntuales en el gen *ARID1A*. MLH1 y MSH2 se analizaron para definir si los tumores podían presentar fenotipo molecular IMS.

La media de alteraciones cromosómicas observadas fue de: a) 3.74 (SD \pm 2.91) para los CNE, con un valor máximo de 9 anomalías detectadas en 4 de 38 casos; b) 3.06 (SD \pm 2.22) para los CE, con un valor máximo de 8 alteraciones detectadas en 1 de 17 muestras; c) 2.86 (SD \pm 3.46) para los CI, con un valor un máximo de 10 anomalías detectadas en 1 de 14 casos (figuras 23 y 24).

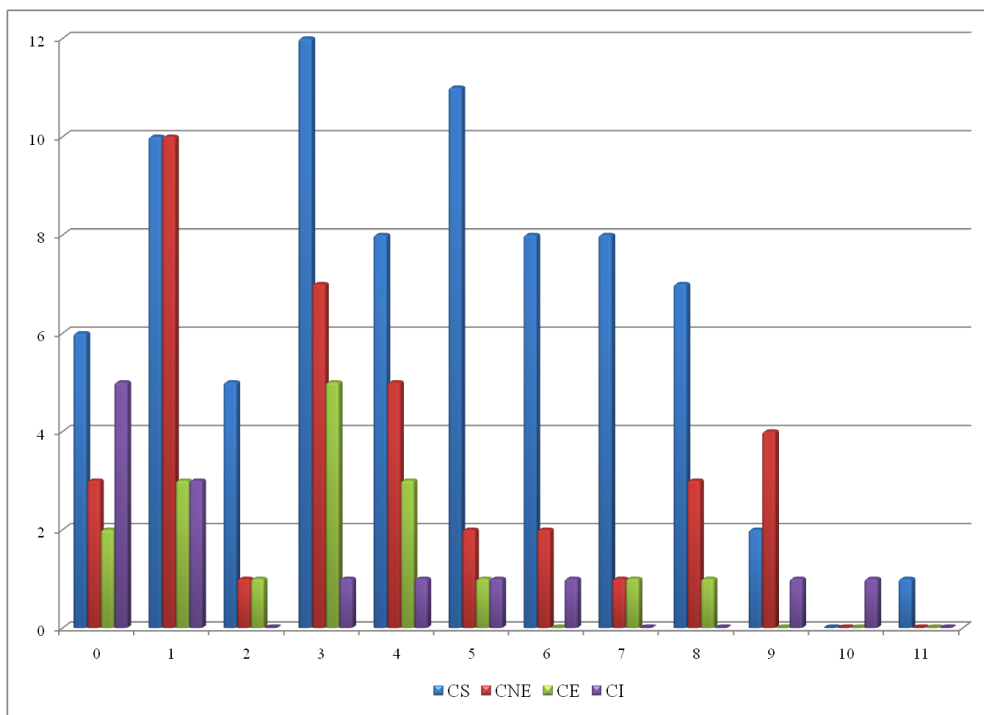


Figura 23. Distribución de las alteraciones cromosómicas en los cuatro subtipos histológicos estudiados (Eje X: número de alteraciones; eje Y: número de casos en los que se han detectado).

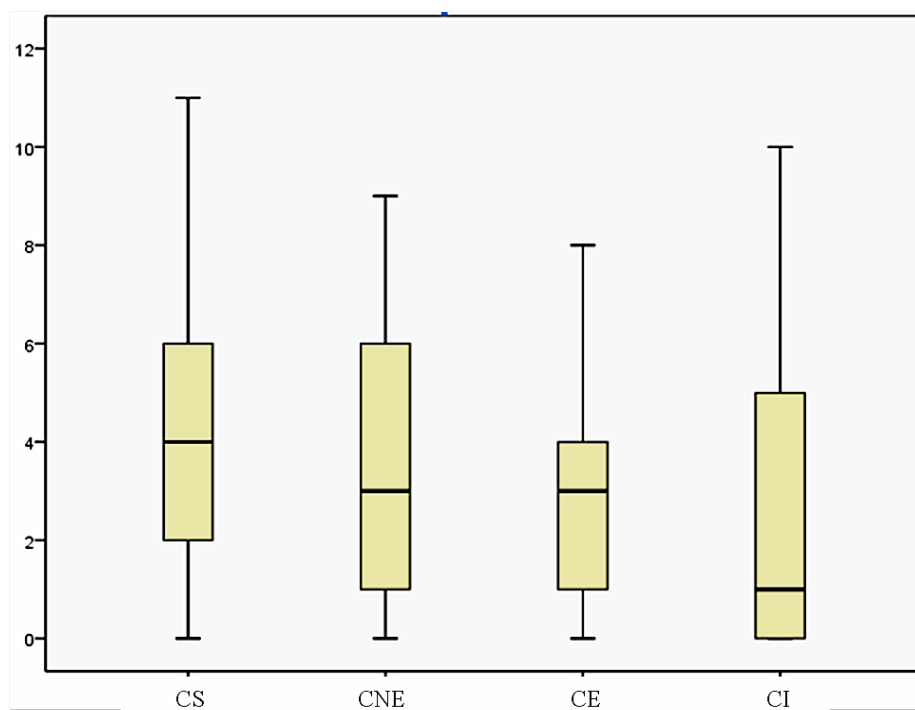


Figura 24. Media de alteraciones y su desviación estándar en función del subtipo histológico.

La aneuploidía se detectó en 16 de los 38 CNE, en 5 de los 17 CE y en 5 de los 14 CI (42%, 29,5% y 35.2% de los casos respectivamente) demostrando que los CS eran tumores claramente más aneuploides que los otros subtipos de carcinomas endometriales de alto grado (figura 25).

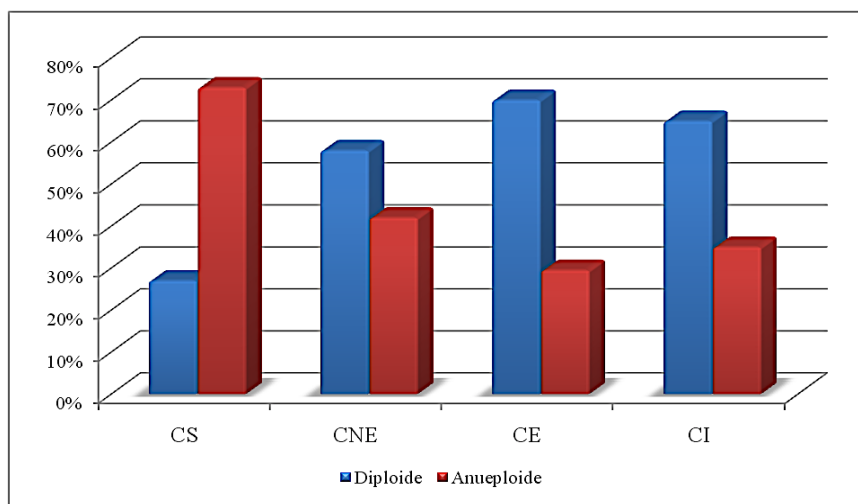


Figura 25. Diferencias observadas en el patrón de aneuploidía observada en los 4 subtipos histológicos.

La monosomía del cromosoma 6 y la pérdida de los genes *RREB1* y *MYB*, localizados en las regiones 6p24.3 y 6q23.3, respectivamente, fueron los hallazgos moleculares más específicos detectados casi únicamente en los CS y previamente no descritos en ninguna otra serie. La monosomía del cromosoma 6 se observó en el 22,2% de los carcinosarcomas (12 de 54 muestras) y en ninguno de los otros carcinomas de endometrio ($p = 0,002$).

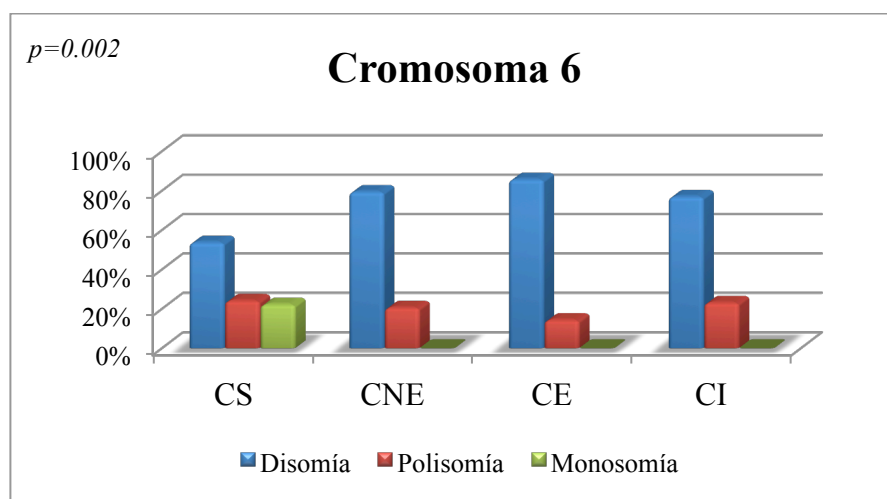


Figura 26. La polisomía del cromosoma 6 se ha detectado con frecuencias parecidas entre los Carcinomas estudiados mientras que la monosomía resulta ser un hallazgo exclusivo de los CS.

La pérdida de los genes *RREB1* y *MYB* se detectó en 12 y 15 muestras de CS de las 55 evaluables (21,8% y 27,3% respectivamente), en un único caso, tanto de los 35 CNE como de los 16 CE (2,9% y 6,3% respectivamente), y en ninguno de los CI. Las diferencias observadas demostraron ser estadísticamente significativas con un *p*-valor igual a **0,001** para el gen *RREB1* e inferior a **0.001** para el gen *MYB*.

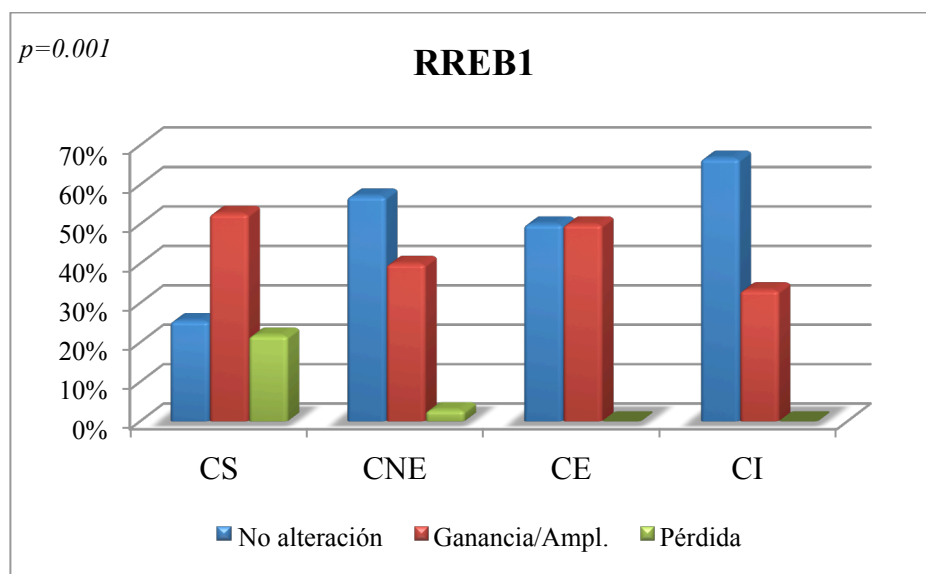


Figura 27. Distribución de las anomalías del gen *RRBE1* en los cuatro subtipos histológicos estudiados.

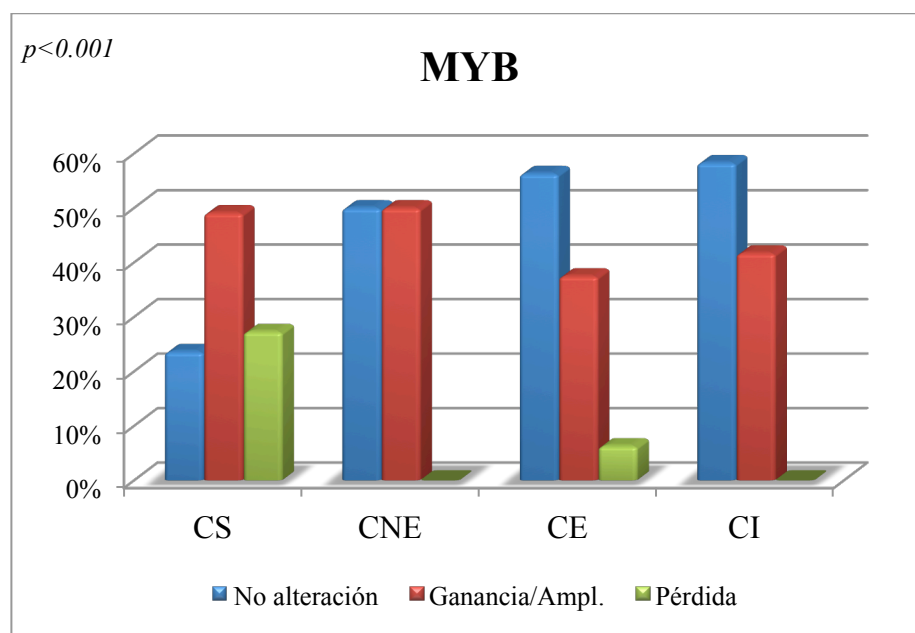


Figura 28. Distribución de las alteraciones del gen *MYB* en los cuatro subtipos histológicos estudiados.

Todos los casos que demostraron monosomía del cromosoma 6 también presentaron pérdida de los genes *RREB1* y *MYB*. Debido a esto, concluimos que la principal alteración molecular causante de la subsecuente pérdida de los dos genes era la monosomía completa del cromosoma. Tres de 15 casos de CS, así como un único caso de CE, resultaron positivos para la delección del gen *MYB*. Este hallazgo lo consideramos como un evento aislado ya que no se evidenció pérdida del gen *RREB1* ni del centrómero del Cromosoma 6 en ninguna de estas muestras.

Las ganancias/amplificaciones que demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro subtipos histológicos estudiados fueron las de los genes *MYC* y *ERBB2*. Las alteraciones numéricas del gen *MYC* se observaron en 13 de 65 CS, en 1 de 12 CE y en 1 de 6 CI (20%, 8,3% y 16,7% de las muestras, respectivamente) y las anomalías relacionadas con el gen *ERBB2* se detectaron en 5 de 37 CNE, 1 de 15 CE y en 1 de 13 CI (13,5%, 6,7% y 7,7% de los casos, respectivamente) y en ninguno de los CS incluidos en esta serie. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas para ambas alteraciones con un *p*-valor de **0.021** y **0.016** respectivamente (figuras 29 y 30).

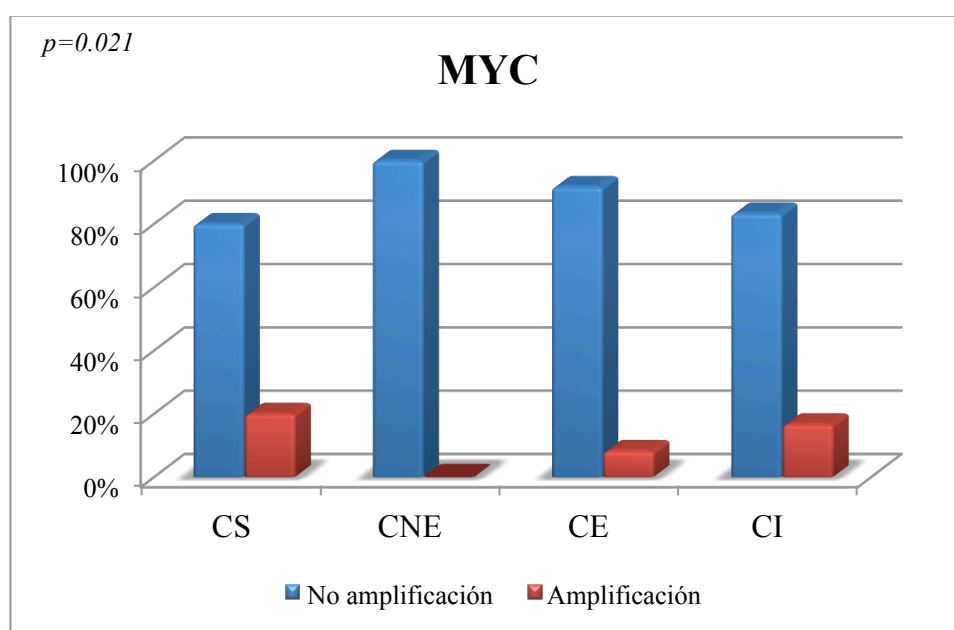


Figura 29. La amplificación del gen *MYC* se observó en los subtipo histológico de los CS, CE y CI.

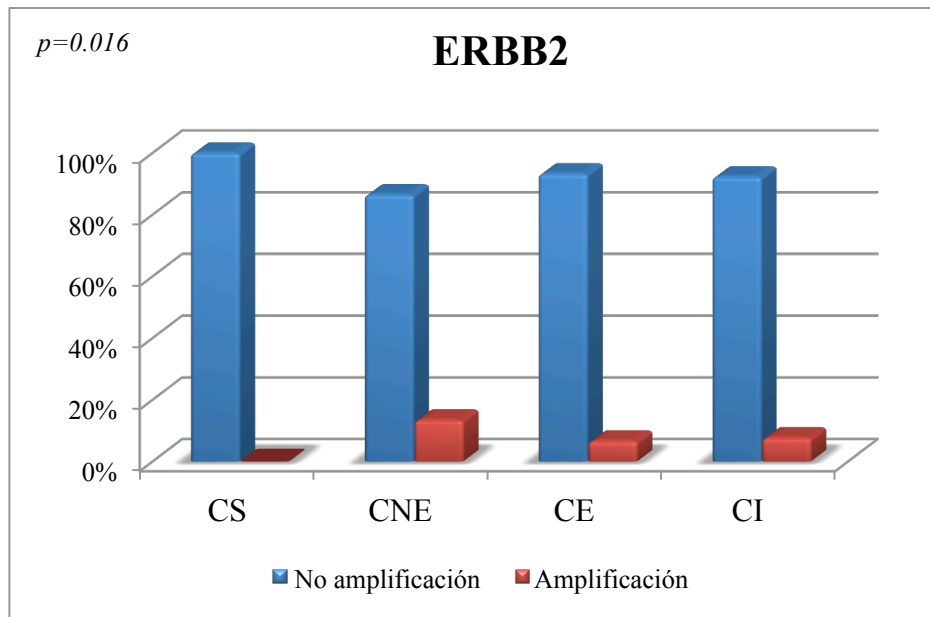


Figura 30. Frecuencia de detección de la amplificación del gen *ERBB2* entre los grupos estudiados.

Las alteraciones relacionadas con pérdida/delección de los genes *PTEN*, *CDKN2A* y *TP53* demostraron también diferencias significativas entre los cuatro subtipos de Carcinomas de Endometrio.

El gen *PTEN* resultó alterado en 36 de 73 CS, 9 de 32 CNE, 9 de 12 CE y 2 de 7 CI (49,3%, 28,1%, 75% y 28,6% de los casos, respectivamente) siendo la alteración más frecuente detectada entre los carcinomas endometrioides grado 3. La diferencia observada entre los grupos resultó significativa con un *p-valor* igual a **0,024**.

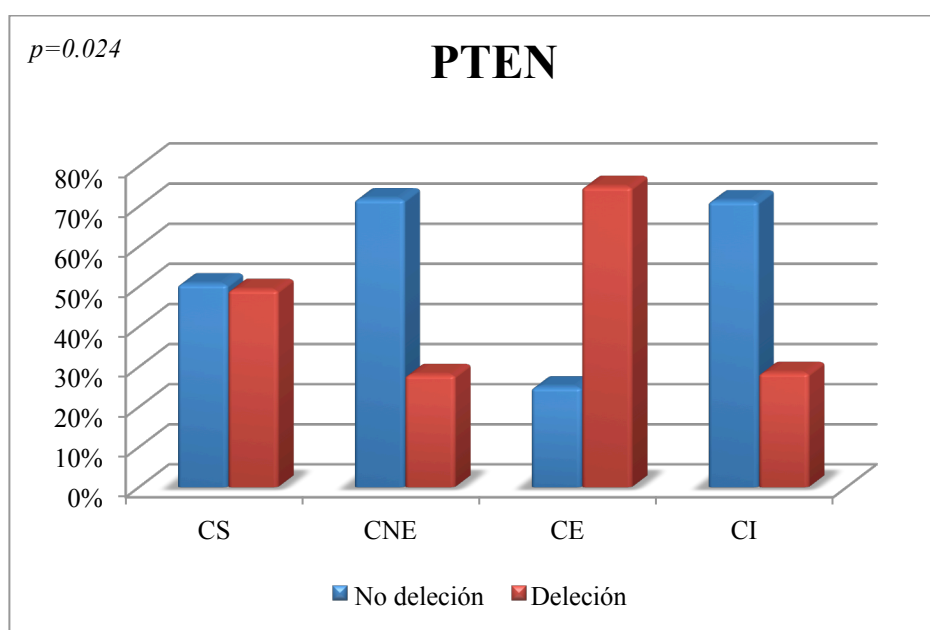


Figura 31. Distribución de la delección del gen *PTEN* en los cuatro subtipos histológicos.

Las delecciones de los genes *CDKN2A* y *TP53* se observaron principalmente en el grupo de los CS (46,7% y 42,1% de las muestras) y menos frecuentemente en los casos de carcinomas indiferenciados. Hemos de destacar que para estos marcadores obtuvimos un alto número de valores perdidos para los cuatro grupos estudiados, debido a problemas relacionados con la eficiencia de hibridación de ambas sondas. Las diferencias observadas fueron significativas para el gen *CDKN2A* pero no para el gen *TP53*.

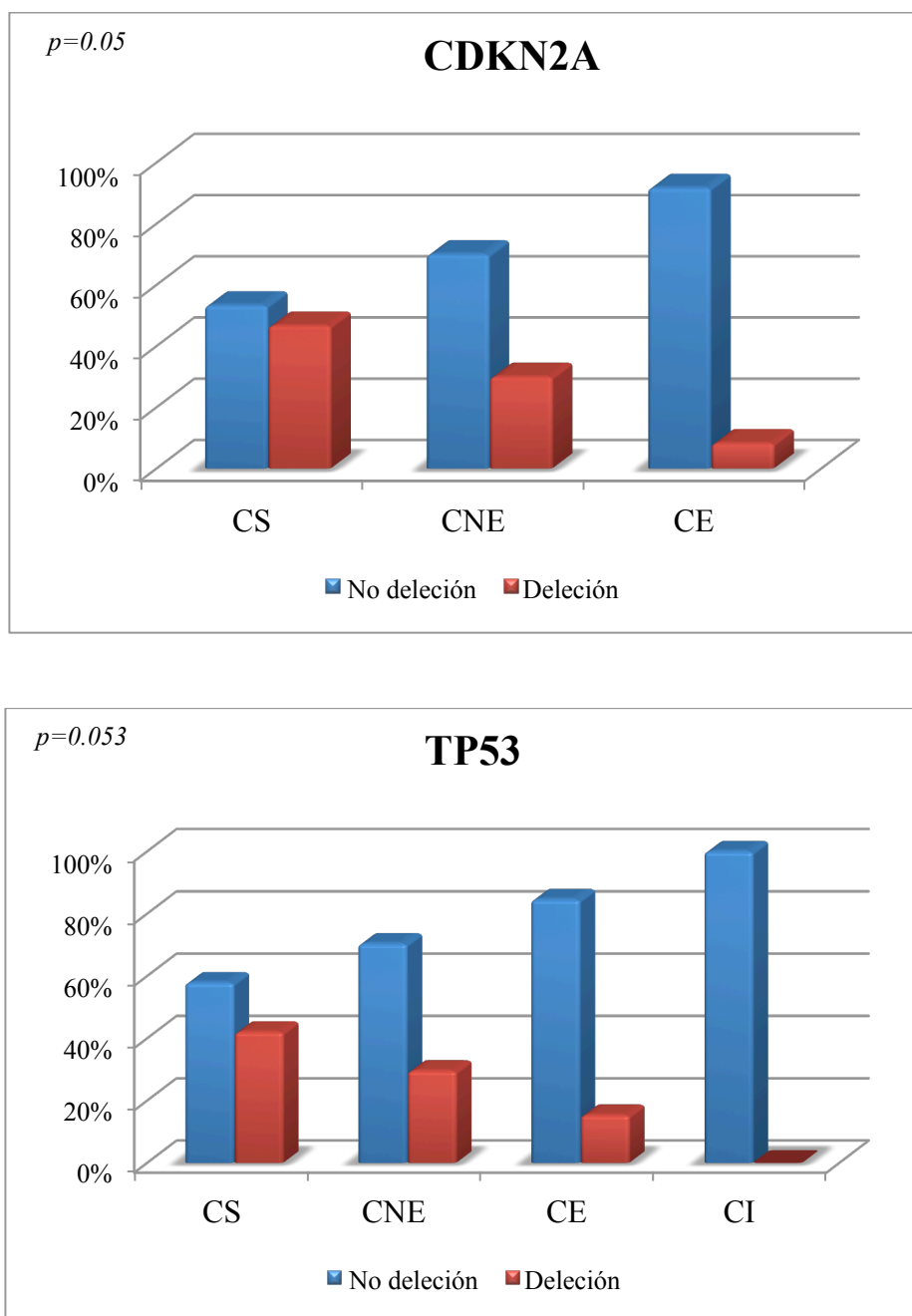


Figura 32. La delección de los genes *CDKN2A* y *TP53* se observó principalmente en los CS seguidos de los CNE.

A continuación, se detalla un resumen de todos los resultados obtenidos en cada uno de los distintos subtipos histológicos de carcinomas endometriales estudiados.

Tabla 16a. Resultados obtenidos para cada uno de los genes y cromosomas estudiados en los distintos subtipos histológicos estudiados.

Gen/Chr.	Evaluación	Fenotipos				p-valor
		CS	CNE	CE	CI	
ALK	No alteración	54/69 78,3%	26/36 72,2%	12/15 80%	11/14 78,6%	NS
	Ganancia	15/69 21,7%	10/36 27,8%	3/15 20%	3/14 21,4%	
MYCN	No alteración	54/69 78,3%	21/28 75%	16/18 88,9%	9/13 69,2%	NS
	Ganancia	15/69 21,7%	7/28 25%	2/18 11,1%	4/13 30,8%	
Chr.2	Disomía	54/69 78,3%	21/28 75%	16/18 88,9%	10/13 76,9%	NS
	Aneusomía	15/69 21,7%	7/28 25%	2/18 11,1%	3/13 23,1%	
CCND1	No alteración	34/57 59,6%	21/33 63,6%	10/14 71,4%	8/15 53,3%	NS
	Ganancia/Ampl.	23/57 40,4%	12/33 36,4%	4/14 28,6%	7/15 46,7%	
RREB1	No alteración	14/55 25,5%	20/35 57,1%	7/14 50%	8/12 66,7%	p=0.005
	Ganancia/Ampl.	29/55 52,7%	14/35 40%	7/14 50%	4/12 33,3%	
	Deleción	12/55 21,8%	1/35 2,9%	0	0	
MYB	No alteración	13/55 23,6%	17/34 50%	9/16 56,3%	7/12 58,3%	p<0.001
	Ganancia/Ampl.	27/55 49,1%	17/34 50%	6/16 37,5%	5/12 41,7%	
	Deleción	15/55 27,3%	0	1/16 6,3%	0	
Chr.6	Disomía/Polisomía	42/54 77,8%	34/34 100%	14/14 100%	13/13 100%	p=0.002
	Monosomía	12/54 22,2%	0	0	0	
EGFR	No alteración	52/78 66,7%	31/38 81,6%	13/18 72,2%	11/15 73,3%	NS
	Ganancia/Ampl.	26/78 33,3%	7/38 18,4%	5/18 27,8%	4/15 26,7%	
Chr.7	Disomía	60/79 75,9%	33/38 86,8%	13/18 72,2%	11/15 73,3%	NS
	Aneusomía	19/79 24,1%	5/38 13,2%	5/18 27,8%	4/15 26,7%	

Tabla 16b. Resultados obtenidos para cada uno de los genes y cromosomas estudiados en los distintos subtipos histológicos estudiados.

Gen/Chr.	Evaluación	Fenotipos				p-valor
		CS	CNE	CE	CI	
MYC	No amplificación	52/65 80%	31/31 100%	11/12 91,7%	5/6 83,3%	p=0.021
	Amplificación	13/65 20%	0	1/12 8,3%	1/6 16,7%	
Chr.8	Disomía	50/68 73,5%	21/31 67,7%	11/12 91,7%	5/6 83,3%	NS
	Aneusomía	18/68 26,5%	10/31 32,3%	1/12 8,3%	1/6 16,7%	
CDKN2A	No delección	32/60 53,3%	21/30 70%	11/12 91,7%	3/5 60%	p=0.05
	Delección	28/60 46,7%	9/30 30%	1/12 8,3%	2/5 40%	
Chr.9	Disomía	48/60 80%	25/30 83,3%	12/12 100%	5/5 100%	NS
	Aneusomía	12/60 20%	5/30 16,7%	0	0	
PTEN	No delección	37/73 50,7%	23/32 71,9%	3/12 25%	5/7 71,4%	p=0.005
	Delección	36/73 49,3%	9/32 28,1%	9/12 75%	2/7 28,6%	
Chr.10	Disomía	60/73 82,2%	28/32 87,5%	12/12 100%	5/7 71,4%	NS
	Aneusomía	13/73 17,8%	4/32 12,5%	0	2/7 28,6%	
ERBB2	No amplificación	59/59 100%	32/37 86,5%	14/15 93,3%	12/13 92,3%	p=0.016
	Amplificación	0	5/37 13,5%	1/15 6,7%	1/13 7,7%	
TP53	No delección	33/57 57,9%	19/27 70,4%	11/13 84,6%	7/7 100%	p=0.053
	Delección	24/57 42,1%	8/27 29,6%	2/13 15,4%	0	
Chr.17	Disomía	37/58 63,8%	24/37 64,9%	12/17 70,6%	13/14 92,9%	NS
	Aneusomía	21/58 36,2%	13/37 35,1%	5/17 29,4%	1/14 7,1%	

Analizamos la distribución de todas las alteraciones estudiadas entre los cuatro subtipos histológicos estudiados mediante un análisis de *cluster* no supervisado y no jerárquico realizado para variables cualitativas. El tipo y número de alteraciones observadas no nos permitió identificar ningún patrón definido de anomalías que se pudiesen asociar de forma específica a algún grupo histológico en concreto (figura 33).

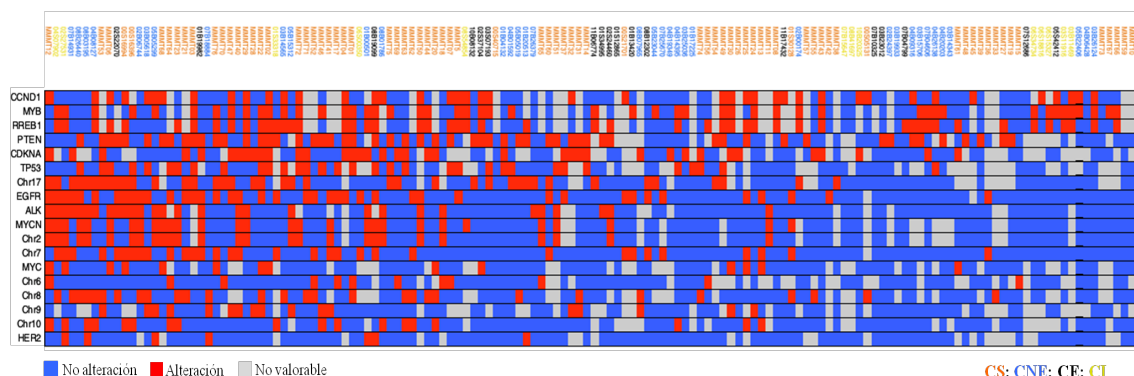


Figura 33 Mapa de calor o “heat-map” que describe la distribución de todas las alteraciones estudiadas entre las distintas muestras de carcinomas endometriales. La figura muestra como las muestras están agrupadas desde las que presentan más a menos alteraciones (desde la izquierda a la derecha del gráfico).

El análisis de asociación entre la expresión proteica de la ciclina D1 y la presencia de ganancia/amplificación del gen *CCND1* detectada en las muestras no resultó estadísticamente significativo. Observamos una correlación interesante entre la sobreexpresión de la proteína p53 y la presencia de alteraciones génicas. La tinción nuclear positiva de p53 suele representar un subrogado inmunohistoquímico de la presencia de mutaciones puntuales del gen *TP53*. Nuestros datos demostraron una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de un mayor número de copias génicas ligadas a trisomía o polisomía del cromosoma 17 y la sobreexpresión proteica. Este hallazgo fue observado en el 81,8% de los carcinomas serosos (9 de 11 casos con aneusomía) y en el 100% de los carcinomas indiferenciados con un *p-valor* de **0.003** y **0.048** respectivamente (figura 34). La tinción nuclear positiva en el caso de los CS y de los carcinomas endometrioides grado 3 se observó en aquellas muestras que demostraron tanto pérdida como aumento en el número de copias génicas.

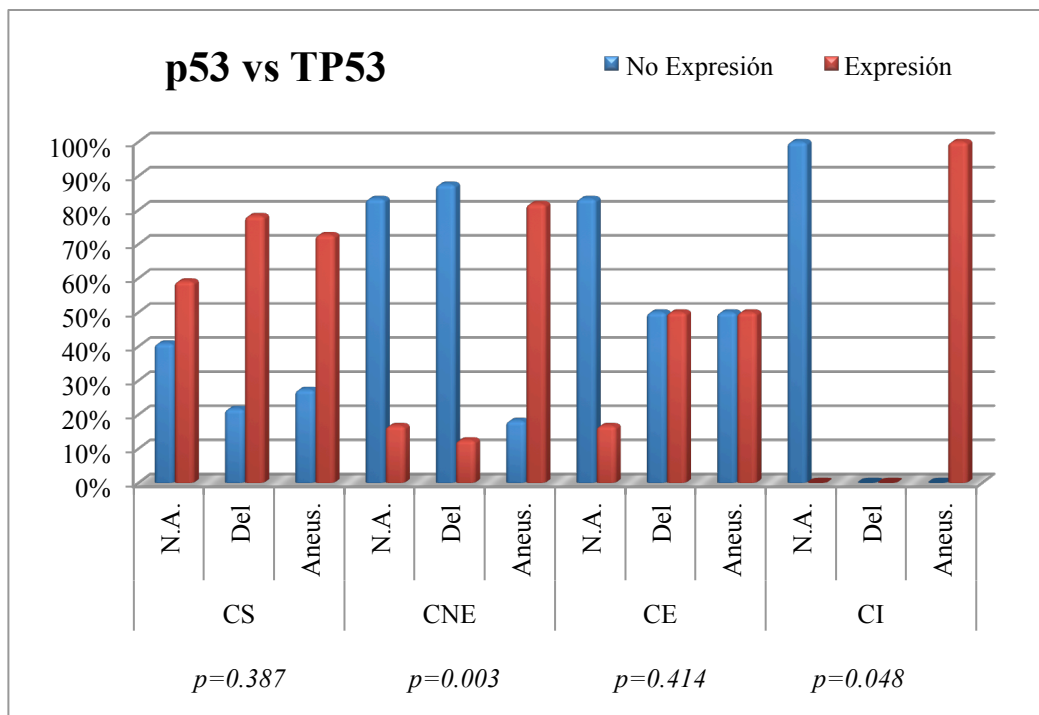


Figura 34. Correlación entre pérdida o aneusomía del gen TP53 y la expresión nuclear de la proteína p53 entre los distintos subtipos histológicos. (N.A.: ninguna alteración; Del.: delección; Anues.: aneusomía).

Por último, analizamos la expresión de la proteína BAF-250 en los cuatro subtipos de carcinomas de endometrio y observamos ausencia de tinción nuclear en sólo el 8,7% de los CS (6 de 69 muestras valorables) a diferencia de las frecuencias observadas en los otros tres subtipos histológicos (28,6% CNE, 33,3% CE y 37,5% CI).

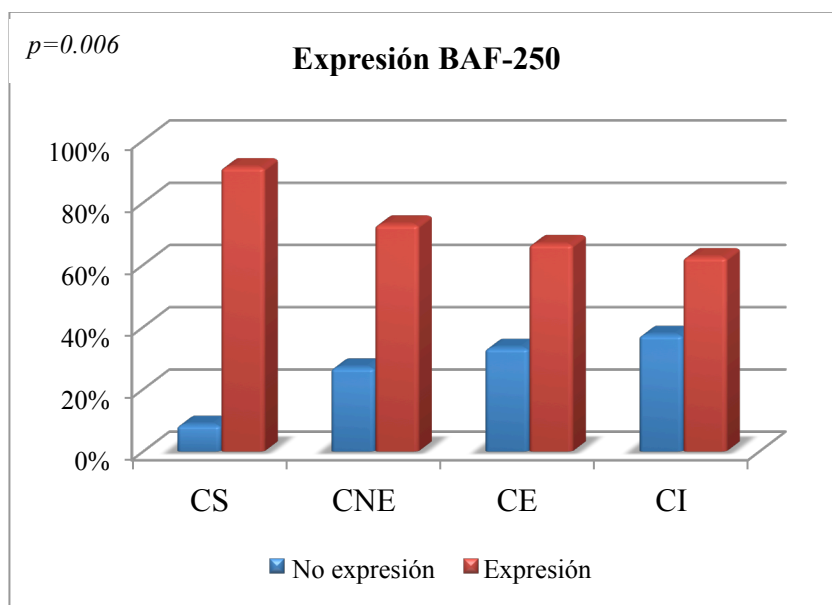


Figura 35. Diferencia significativa entre el patrón de expresión de BAF-250 en los cuatro grupos estudiados.

4.4 Resultados IV

Analizar las posibles diferencias en el patrón de alteraciones cromosómicas en los carcinosarcomas atendiendo a la nueva clasificación molecular del carcinoma de endometrio.

El cuarto objetivo propuesto para este trabajo de tesis fue analizar las posibles diferencias en el patrón de alteraciones cromosómicas en los CS atendiendo a la nueva clasificación molecular del carcinoma de endometrio. Disponíamos de los datos relativos a la expresión de la proteína p53 y de las proteínas reparadoras MLH1 y MSH2, de los datos relacionados con la determinación de la Inestabilidad de Microsatélites [139, 148, 152] y de todos los datos relacionados con las alteraciones numéricas de distintos genes y cromosomas. Usando la misma clasificación propuesta en el estudio “*PromiSe*” [157], a excepción del grupo de las muestras con mutaciones en el gen *POLE*, definimos tres subgrupos moleculares: a) *p53/CNV-High*; b) *CNV-Low/Otro*; c) *MSI-High*. Considerando únicamente los marcadores inmunohistoquímicos estudiados, clasificamos a nivel molecular nuestra serie de 83 CS de endometrio. Observamos que el 68% de las muestras eran tumores que presentaban principalmente sobreexpresión nuclear de p53 (56 de 82 casos evaluables) y el restante 32% eran muestras que se podrían clasificar como *CNV-Low/Otro* (26 de 82 casos). Ningún caso demostró pérdida de expresión de las proteínas reparadoras (figura 36).

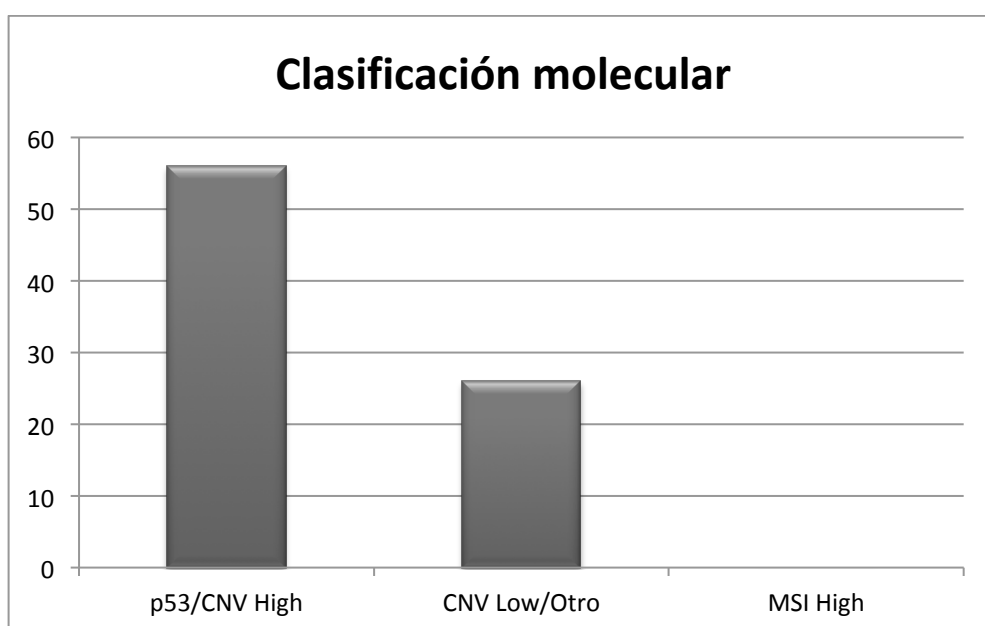


Figura 36. Distribución de las muestras de carcinosarcomas atendiendo a la clasificación molecular.

Analizando la distribución y el número medio de alteraciones dentro de cada grupo (figura 37), observamos que el grupo **a** se caracterizaba por una media de 4,67 anomalías numéricas y estructurales ($SD \pm 2,78$) y el grupo **b** con una media de valores de 3,27 ($SD \pm 2,1$).

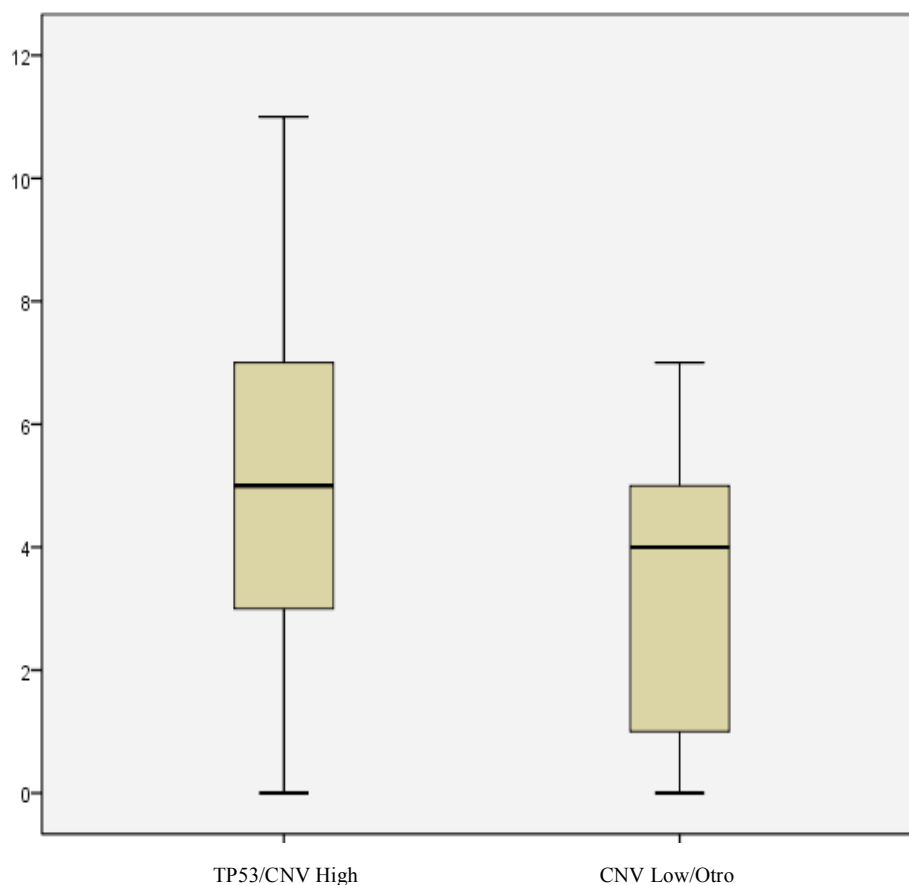


Figura 37. Media de alteraciones y su desviación estándar de las muestras incluidas en los tres grupos moleculares propuestos.

Nuestros resultados evidencian que los CS son tumores que se asocian principalmente a sobreexpresión de p53, debido a mutaciones puntuales o a otras alteraciones concomitantes en el gen *TP53*, y que suelen ser neoplasias con un elevado índice de variaciones en el número de copias génicas. El número medio de alteraciones detectadas en el grupo **a** hace hincapié en este dato, aportando ulterior evidencia de la concordancia obtenida entre los datos inmunohistoquímicos y moleculares de nuestra serie y la clasificación molecular propuesta para los distintos tipos de carcinomas endometriales.

5. DISCUSION

Los carcinosarcomas de endometrio (CS) son neoplasias muy poco frecuentes, que representan menos del 5% de todos los carcinomas de endometrio. Debido a esto, junto al limitado número de estudios presentes en la literatura sobre las alteraciones moleculares características de esta patología, decidimos elegir este tipo de tumores, ya que pudimos disponer de una serie grande y bien caracterizada histológicamente.

Los CS se caracterizan por la presencia de células malignas epiteliales y mesenquimales entremezcladas, en menor o mayor medida, lo cual ha generado durante años un importante debate sobre su histogénesis. A lo largo de los años, se han propuesto tres teorías principales: la teoría de colisión, la teoría de combinación y la teoría de conversión o de metaplasia monoclonal [158]. Esta última, que postula que ambos componentes se originan a partir de una única célula progenitora maligna, ha sido la que durante estas últimas décadas ha ido consolidándose a nivel científico. Los estudios de monoclonalidad y el patrón de inactivación del cromosoma X han demostrado los mismos resultados entre ambos componentes del mismo tumor, indicando la naturaleza clonal de las células epiteliales y mesenquimales [133, 159]. Resultados análogos se han obtenido estudiando distintas alteraciones moleculares, como por ejemplo marcadores microsatélites altamente polimórficos, mutaciones en los genes *TP53* y *KRAS* o pérdida de heterocigosidad de distintos *loci*, sin hallar diferencias significativas entre el componente epitelial y mesenquimal de los CS [158, 159]. Finalmente, distintos trabajos han evidenciado como los CS representen un claro modelo de transición epitelio-mesénquima gracias al estudio de las diferencias de expresión de proteínas epiteliales y mesenquimales así como perfiles de expresión génica, tanto a nivel de ARN mensajero como de los microRNAs claramente específico de uno o del otro componente histológico [148, 152, 160].

En este estudio hemos analizado distintos marcadores inmunohistoquímicos y moleculares para una mejor caracterización de esta entidad y determinar posibles diferencias con los carcinomas endometrioides y serosos de endometrio, así como para evidenciar si existen diferencias entre el componente epitelial y sarcomatoso de los CS, que nos permitan obtener indicios de los mecanismos implicados en la TEM en estos tumores.

Características inmunohistoquímicas

Analizamos el perfil de expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos en ambos componentes histológicos de los CS. Centrándonos específicamente en el componente epitelial, nuestros resultados demostraron sobreexpresión de p53 en el 67,1% de los tumores (51 de 76 casos evaluables) y expresión nuclear de la proteína p16 en un total de 45 CS de los 76 evaluables (59,2%). Siempre en el mismo componente, el 8,7% de las muestras (6 de 69 casos evaluables) demostró ausencia de tinción inmunohistoquímica para la proteína BAF-250 y ningún caso resultó positivo para la expresión nuclear de β -catenina; la expresión de las proteínas reparadores MLH1 y MSH2 estuvo conservada en todos los casos y el 92,7% de las muestras estudiadas demostró presencia de tinción nuclear para ciclina D1 (51 de los 55 tumores evaluables). La positividad intensa de membrana de la proteína HER2 se detectó en un único caso de los 69 evaluables (1,5%). No se encontraron diferencias entre el componente epitelial y el mesenquimal en ninguno de ellos a excepción del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

Observamos expresión de membrana intensa y difusa para el marcador EGFR en el 71% de los casos, de los cuales el 24% demostraron tinción únicamente en el componente epitelial, el 50% sólo en el componente mesenquimal y el restante 26% de casos en ambos simultáneamente. Distintos estudios han evidenciado que la sobreexpresión de este marcador en los CS es un hallazgo bastante frecuente, con porcentajes que varían desde un 58% hasta un 82% de casos positivos, según las series estudiadas [21, 140, 141]. Nuestros resultados evidencian que existe diferencia de expresión entre el componente epitelial y el mesenquimal, siendo más frecuente en este último. Los datos presentes en la literatura describen porcentajes parecidos a los que hemos observado en nuestra serie: 13% de casos con sobreexpresión en el componente carcinomatoso frente a un 45% de tumores con sobreexpresión en el componente sarcomatoso, según la serie de Bland et al. [21], 24% de inmunotinción en el componente epitelial frente a un 44% en el componente mesenquimal descrito por el grupo de Livasy et al. [141] y un 30% de casos con expresión en la diferenciación carcinomatosa frente a un 67% de casos con expresión en la diferenciación sarcomatosa según la serie de Cimbaluck et al. [140]. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de EGFR puede jugar un papel importante en el proceso de TEM de los CS y que podría estar relacionada con el comportamiento más agresivo, propio de estos tumores, en comparación con otras

neoplasias endometriales. La frecuencia con la que se ha descrito en la literatura la expresión de EGFR en los CS es superior a la observada en los carcinomas de endometrio, en los cuales se ha asociado con alto grado histológico, mayor invasión del miometrio, comportamiento clínico más agresivo y peor pronóstico, principalmente en pacientes con edad superior a los 50 años [141]. Las posibles implicaciones terapéuticas relacionadas con la sobreexpresión de este marcador, a diferencia de lo que ocurre en los carcinomas colorrectales metastásicos, siguen siendo controvertidas.

Observamos sobreexpresión de p53 en el 67,1% de los tumores y una concordancia en el perfil de tinción observado entre los dos componentes en el 97,4% de los casos. La expresión nuclear de la proteína p16 se detectó en un total de 49 CS de los 76 evaluables: el 81,6% de las muestras demostraron tinción inmunohistoquímica en ambos componentes, un 10,2% sólo en el mesenquimal y 8,2% sólo en el epitelial. Distintos estudios se han centrado en las vías de señalización mediadas por las proteínas p53 y p16 en los CS, utilizando estos marcadores inmunohistoquímicos como subrogados para detectar alteraciones moleculares [135, 161-163]. El alto nivel de concordancia de expresión entre el componente epitelial y mesenquimal evidenciado en este estudio para ambos marcadores es acorde a los datos presentes en la literatura, que hablan de una concordancia del 84.2%, 88.3% y 95.8%, según las series estudiadas [135, 138, 161, 162, 164-167].

La ausencia de diferencias significativas en el perfil de expresión observado entre el componente epitelial y mesenquimal para la mayoría de los marcadores inmunohistoquímicos, junto con los otros trabajos publicados por nuestro grupo de investigación sobre los estudios de transición epitelio-mesenquima en los CS [148, 152], aportan datos adicionales a favor de la teoría de conversión o de metaplasia monoclonal propuesta para este tipo de tumores.

Alteraciones moleculares en oncogenes específicos

Los CS son tumores altamente agresivos para los cuales la estadificación quirúrgica y la citorreducción en unión con la quimio y radio terapia representan las mejores alternativas terapéuticas disponibles. A pesar de estos tipos de tratamiento, la tasa de respuesta es baja (7-33%) y la probabilidad de una recidiva afecta básicamente a

todas las pacientes [144, 168]. El número de ensayos clínicos disponibles para esta patología, tal y como consta en bases de datos como www.clinicaltrials.gov, asciende a un total de 40 estudios, de los cuales sólo 24 se encuentran finalizados, principalmente centrados en el uso de agentes quimioterápicos (paclitaxel, docetaxel y los derivados del platino) y sólo algunos basados en el uso de nuevos medicamentos dirigidos frente a dianas terapéuticas. Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de las alteraciones moleculares en un grupo de oncogenes que son biomarcadores predictivos de respuesta a tratamiento.

Uno de los resultados más interesante de nuestra serie ha sido que casi la mitad de los CS han presentado una o más mutaciones en los oncogenes involucrados en las vías de señalización PI3K/AKT y/o RAS/RAF. Estas vías juegan un papel importante en la transmisión de las señales celulares a través de sistemas de transducción hacia el núcleo, influenciando importantes procesos celulares como el crecimiento, la proliferación y la apoptosis. Numerosos trabajos han estudiado la frecuencia de mutaciones en estos genes asociados con la patogénesis, clasificación y terapias dirigidas en CEE y CNEE [57, 65, 68, 169]; sin embargo, pocos estudios, con un número de casos más reducido que nuestra serie, han analizado estas alteraciones en los CS. Las mutaciones en el gen *PIK3CA* ocurren principalmente en los exones 9 y 20, como se han descrito previamente y se han identificado en un 15% de los carcinomas serosos [69, 170] y entre un 24% y un 40% de los CEE [65, 66, 68]. Un 17% de los 34 CS analizados en nuestro estudio, mediante el ensayo *OncoCartaTM*, han resultado ser positivos para una mutación en el gen *PIK3CA*, de las cuales 3 en el exón 9 (E542K, E545K, Q546K), 2 en el exón 20 (M1043I y H1047R) y una en el exón 1 (R88Q). Las mutaciones localizadas en el exón 1 que afectan el dominio amino-terminal de la sub-unidad p110 α (Arg88, Arg93, and Lys111) se han descrito en la literatura como frecuentes y características de los carcinomas de endometrio [57] y las alteraciones en el exón 20 se han asociado a peor pronóstico en los CEE [66]. Los datos presentes en la literatura sobre los CS y las mutaciones en este gen son escasos: Growdon et al. [143] han detectado anomalías en este gen en 10 de 31 casos estudiados (32%), mientras que el grupo de Murray et al. describe una frecuencia de mutación del 11% (2/18 muestras) [144]. Dos estudios más recientes, llevados a cabo mediante secuenciación masiva, uno realizado por Jones et al. y otro por Cherniack et al., han detectado mutaciones en el 41% (9/22) y en el 28% (16/57) de los casos respectivamente [145, 171]. Nuestros resultados, en unión con los datos presentes en la

literatura, indican que el gen *PIK3CA* es uno de los oncogenes principalmente alterado en este tipo de tumores.

Hemos detectado la presencia de la alteración E17K en el gen *AKT1* en un único caso de CS, hallazgo que no ha sido reportado en ninguna otra serie incluyendo los tumores estudiados por el TCGA. Este tipo de alteraciones han sido identificadas principalmente en los CEE, aunque sólo en el 2% y 4% de los tumores estudiados.

Las mutaciones detectadas en los genes codificantes de proteínas involucradas en la cascada de señalización PI3K/AKT se asocian a sensibilidad a los inhibidores de mTOR, como la rapamicina, aunque estudios presentes en la literatura han evidenciado que la presencia concomitante de mutaciones en los genes *PIK3CA* y *KRAS* o *BRAF* podrían asociarse a resistencia a everolimus [172, 173].

La frecuencia de mutación en el gen *KRAS* se sitúa entre el 10% y 30% de todos los CEE y entre el 5% y 10% de los CNEE; frecuencias análogas se han obtenido en los estudios publicados por el TCGA: en el 25,63% de los carcinomas endometrioides (105 de 409 casos) y en el 2,27% de carcinomas serosos (3 de 115 muestras) se ha detectado una alteración en este gen [70]. En nuestro estudio hemos encontrado alteraciones en al menos uno de los genes de la vía RAS/BRAF en el 17,6% de los CS estudiados (6 de 34 muestras): 3 casos con mutaciones en el gen *KRAS* (8.8%), 2 en *NRAS* (5.9%) y 1 en *BRAF* (2.9%). La frecuencia de mutaciones en los genes *RAS* detectada en nuestra serie es acorde a los datos presentes en la literatura: 5-25% de alteraciones en el gen *KRAS* [133, 143, 144] y 3% en el gen *NRAS* [80, 143]. Cabe destacar que las series de CS analizadas mediante secuenciación masiva por Jones et al. y Cherniack et al., si bien demuestran la presencia de mutaciones en el gen *KRAS* con porcentajes de muestras positivas análogas a los de otros estudios, no evidencian alteraciones ni en el gen *NRAS* ni en *BRAF*. De hecho, en ninguna otra serie se ha detectado la presencia de mutaciones en este último gen, a pesar de que nosotros hayamos encontrado un único caso con la mutación G469V, alteración previamente descrita en los CCR y en los melanomas. De los 11 casos de CS positivos para las mutaciones en el gen *PIK3CA*, 2 de ellos también resultaron ser positivos para una alteración en el gen *KRAS* o *NRAS* sugiriendo, por tanto, que estos tumores no serían buenos candidatos para el tratamiento con los inhibidores de mTOR. Actualmente no existen ensayos con everolimus o sirolimus y el único ensayo en fase II, iniciado en enero 2010 y terminado en octubre 2012 para testar el

fármaco temsirolimus, sólo ha podido reclutar ocho pacientes. Entre los criterios de inclusión no se contemplaba el análisis mutacional de algunos de estos genes. La baja respuesta y eficacia del tratamiento observadas podría deberse en parte a la inadecuada selección de las muestras en estudio (www.clinicaltrials.gov).

Las mutaciones detectadas en nuestra serie en los genes *KIT* y *PDGFRA* no han sido previamente descritas en la literatura. Ambos proto-oncogenes codifican para receptores tirosin-cinasa de superficie y se encuentran alterados principalmente en los tumores del estroma gastrointestinal (GIST), melanomas y desordenes mieloproliferativos. Los datos relacionados con la expresión de *PDGFRA* en los CS es limitada [174], mientras que los obtenidos para la expresión de CD117 son contradictorios [175-177]. A pesar del análisis retrospectivo de estas series sobre la expresión proteica de estos dos marcadores, ningún estudio ha podido detectar alteraciones a nivel génico [144, 175-177]. Nuestro estudio ha evidenciado la presencia de mutaciones en seis de los 34 CS analizados: 4 casos positivos (11,7%) para la mutación puntual D1071N en el exón 18 del gen *PDGFRA*, que produce una sustitución aminoacídica en el dominio catalítico de la proteína y 2 casos positivos (5,9%) para las mutaciones con cambio de sentido D52N y V559G, detectadas en los exones 2 y 9, respectivamente del gen *KIT*. La alteración D52N ha sido descrita en los desordenes mieloproliferativos, mientras que la mutación V559G está principalmente asociada con la mastocitosis. Uno de los tumores analizados ha resultado ser positivo para una mutación en el gen *KIT* y una en el gen *PDGFRA* simultáneamente; aunque en los GIST estas alteraciones se consideran mutuamente excluyente, en los CS podrían indicar un nivel de heterogeneidad clonal diferente a la de otros tumores. Los ensayos en fase II que han testado como tratamiento los inhibidores tirosin-cinasa, sorafenib o imatinib, han demostrado tasas de respuesta del 0% al 5%; en este caso, como ocurrido con el ensayo de fase II para el temsirolimus, la población de estudio no ha sido seleccionada por la presencia de una mutación predictiva de respuesta a tratamiento.

El análisis mediante el *OncoCarta*TM Panel nos ha permitido detectar, por último, alteraciones no descritas previamente en los genes *EGFR* y *MET* en el 5,9% de los casos (2 de 34 CS para ambos marcadores). Las mutaciones en los exones 14, 18, 19, 20 y 21 del gen *EGFR* en el carcinoma no microcítico de pulmón se asocian a sensibilidad y/o

resistencia al tratamiento con los inhibidores de la actividad tirosin-cinasa del propio receptor de membrana. Nuestro estudio ha evidenciado la presencia de la mutación puntual N771_P772, una pequeña delección de 4 nucleótidos (GCGT) en el exón 15, cuyo posible significado clínico no está bien definido. La activación aberrante de la vía de señalización HGF/MET se ha descrito en numerosos procesos neoplásicos [178]. Las mutaciones puntuales R970C y T992I (a veces descritas en la literatura como R988C y T1010I según el estudio) del gen *MET* son variantes que deberían ser capaces de inducir la transformación maligna y contribuir a la oncogénesis, aunque su relevancia biológica en los CS y en otras neoplasia sigue siendo controvertida debido a que han sido identificadas en diferentes cohortes tanto de pacientes como de individuos sanos [179].

Tabla 17. resumen de las frecuencias de las mutaciones detectadas en nuestro estudio y los datos presentes en la literatura [57, 65, 66, 69, 85, 133, 140, 143, 145, 171, 172].

Genes	Nuestra serie	Cherniack	Jones	Otros estudios
PIK3CA	6/34 (17%)	28% (16/57)	41% (9/22)	24,5% (12/49)
AKT	1/34 (2.9%)	-	-	-
KRAS	3/34 (8.8%)	12% (7/57)	27%	20,5% (15/73)
NRAS	2/34 (5.9%)	-	-	3,2% (1/31)
BRAF	1/34 (2.9%)	-	-	-
PDGFRA	4/34 (11.7%)	-	-	-
KIT	2/34 (5.9%)	-	-	-
EGFR	2/34 (5.9%)	-	-	-
MET	2/34 (5.9%)	-	-	-
CTNNB1	0/18	-	14% (3/22)	3,2% (1/31)

Alteraciones cromosómicas

El estudio de las alteraciones cromosómicas ha demostrado en nuestra serie de CS que las ganancias y amplificaciones son las anomalías principalmente presentes para los oncogenes *ALK*, *MYCN*, *CCND1*, *EGFR* y *MYC* mientras que las delecciones han sido las principales alteraciones observadas para los genes supresores de tumor *CDKN2A*, *PTEN* y *TP53*. En el caso de los genes *RREB1* y *MYB* se han detectado tanto delecciones como ganancias/amplificaciones, siendo estas últimas las más frecuentes.

El oncogen *MYB* (región cromosómica 6q23.3) codifica una proteína constituida por tres dominios de unión al ADN con motivo hélice-giro-hélice que funciona como regulador de la transcripción. Juega un papel fundamental en la regulación de la hematopoyesis y puede padecer reordenamientos, en distintas neoplasias hematológicas como leucemias y linfomas, o sufrir también traslocaciones propias de los tumores solidos como la fusión génica *MYB-NFIB*, en los carcinomas adenoides quísticos de mama o glándula salival, o bien la fusión de los genes *MYB-QKI* en los gliomas pediátricos angiocéntricos [180, 181]. Las alteraciones específicas de locus más frecuentes en nuestra serie se han detectado en el este oncogen, con un 76,4% de casos positivos (42 de 55 muestras) para al menos una anomalía estructural/numérica: hemos observado ganancia o amplificación génica en el 49,1% de los tumores y delección en el restante 27,3% de los casos (27 y 15 de 55 CS respectivamente). Las ganancias y amplificaciones de este gen se han descrito principalmente en un subgrupo de leucemia linfoblástica aguda T; hasta un tercio de los canceres hereditarios de mama con mutaciones en el gen *BRCA1* muestran amplificación a nivel somático [182] y se ha descrito, también, en hasta un 10% de los carcinomas de páncreas [183]. Las delecciones son un hallazgo referido fundamentalmente en las lesiones melanocíticas, principalmente relacionadas con alteraciones segmentarias o totales del brazo q del cromosoma 6 o por monosomía completa del mismo. Estas alteraciones no se han señalado previamente en los carcinosarcoma uterinos. Cherniack et al. han evidenciado en el 20% de los tumores estudiados por el TCGA la presencia de una delección focal recurrente en la región cromosómica 6q26, situada a 26,1 Mb del oncogen *MYB* [171].

El gen *RREB1* (región cromosómica 6p24.3) codifica un factor de transcripción con motivo de unión al ADN mediante dedo de zinc capaz de unirse a los elementos de respuesta a RAS, situados en los promotores génicos (*RAS-Responsive Elements Binding 1*). Si bien se ha demostrado su papel en la diferenciación celular inducida por la sobreexpresión de calcitonina y la activación de la vía de señalización RAS-RAF, muy pocas neoplasias suelen albergar alteraciones relacionadas con este gen, a excepción de las ganancias y delecciones descritas en lesiones melanocíticas [184] o las mutaciones puntuales detectadas principalmente en los carcinomas ductales de páncreas [185]. Hemos encontrado alteraciones numéricas/estructurales en el 74,5% de los CS (41 de 55 muestras): ganancia o amplificación génica en el 52,7% de los tumores y delección en el restante 21,8% (29 y 12 de 55 CS respectivamente). Al igual que el oncogen *MYB*, estas

anomalías no se han descrito previamente en los carcinosarcomas uterinos. La serie analizada por el TCGA describe la presencia de ganancia/amplificación de la región 6p24.2 en el 65% de los casos estudiados (37 de 57 tumores), porcentaje de detección semejante al que hemos detectado en nuestro estudio, pero sin evidenciar afectación del *locus* del gen *RREB1*.

El análisis de posibles alteraciones numéricas realizado en nuestra serie de CS, ha evidenciado la presencia de polisomía del cromosoma 6 en el 27,8% de los casos y monosomía en el 22,2% de los tumores. Estos valores han de ser relacionados con las frecuencias de ganancia/amplificación y/o delección observadas en los genes *MYB* y *RREB1*; de hecho, la monosomía del cromosoma 6 y delección del gen *RREB1* se ha detectado en los mismos tumores, así como para el gen *MYB*, a excepción de 3 casos; por tanto, deberíamos concluir que este evento puede corresponder a una delección focal y específica de esa región. La polisomía explicaría también muchos de los casos en los que hemos observado aumento en el número de copias de ambos genes; el restante porcentaje de casos, no relacionados con la alteración numérica del propio cromosoma, se deberían a regiones amplificadas de manera aislada.

La monosomía parcial 6q se asocia a pronóstico infausto y a tumores de comportamiento más agresivo, como pueden ser la LLC, el meduloblastoma y el ependimoma [186-188], mientras que las ganancias del brazo 6p se han descrito en el carcinoma renal y melanoma uveal y se han asociado a estadios más avanzados y con peor pronóstico [189, 190]. Las anomalías relacionadas con el cromosoma 6 se han referido en carcinomas de endometrio con diferencias específicas relacionadas con el subtipo histológico analizado. La ganancia del brazo p se ha detectado principalmente en los CEE poco diferenciados mientras que, entre los CNEE, las ganancias de ambos brazos serían más frecuentes en los carcinomas serosos y las delecciones del brazo q el hallazgo molecular más frecuente de los carcinomas de células claras [123]. Estas alteraciones parecen, por tanto, estar presentes en neoplasias endometriales de alto grado histológico por lo que su detección en nuestra serie de carcinosarcomas, podría tener relación con el comportamiento clínico agresivo y el pronóstico adverso propio de estas neoplasias.

La pérdida del gen *PTEN* (región cromosómica 10q23) ha sido detectada en 36 de 73 CS analizados (49,3% de las muestras), 5 de los cuales (13,8%) han demostrado la presencia de delección en homocigosis para el locus estudiado. La inactivación del gen se

produce por mutaciones somáticas y/o pérdida de heterocigosidad (LOH): las primeras pueden producirse tanto a nivel germinal (síndrome de Cowden, síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba) como a nivel somático; mientras que las deleciones son eventos descritos casi exclusivamente en las neoplasias y suelen producirse en hasta un 40% de los CEE, en alrededor del 50% de los carcinomas de próstata y entre el 30-45% de los glioblastomas entre otros tumores [191-194]. La deleción en homocigosis se ha señalado en tumores de alto grado, más agresivos y con peor pronóstico [195]. Los datos presentes en la literatura relacionados con el estudio de las alteraciones del gen *PTEN* en los carcinosarcomas uterinos se centran fundamentalmente en la detección de mutaciones génicas puntuales. La serie de CS estudiados por el TCGA ha evidenciado la presencia de deleción en la región 10q23 en el 33,3% de los casos (19 de 57 tumores) y en sólo uno de ellos (1,79%) se refiere la pérdida en homocigosis de la misma. La ausencia de proteína PTEN ha demostrado ser un factor clave en los procesos de carcinogénesis, alterando los mecanismos de control de la apoptosis y de la proliferación célula; más recientemente, se ha demostrado que su ausencia en las células tumorales afectaría negativamente la integridad genómica y la correcta segregación de los cromosomas, aumentando, por tanto, el nivel de inestabilidad genómica de las neoplasias. El 80,5% de los tumores positivos en nuestra serie para la deleción del gen *PTEN* han demostrado niveles elevados de inestabilidad cromosómica, con un mínimo de 3 hasta un máximo de 8 alteraciones, remarcando la importancia de la inactivación de la proteína PTEN en estas neoplasias.

Las aneusomías detectadas para el cromosoma 10 en el 17,8% de los CS (13 de 73 casos) han sido exclusivamente trisomías o polisomía, hallazgos también descritos en distintas series de carcinomas de endometrio, postulándose que estas alteraciones numéricas puedan constituir un evento temprano en la progresión tumoral de las neoplasias endometriales [127]. A diferencia del cromosoma 6, no hemos observado presencia de monosomía del cromosoma 10, hallazgo que habría podido explicar o tener correlación con algunos de los casos en los cuales hemos identificado la deleción del gen *PTEN*, indicando ~~por lo tanto~~ que la pérdida génica se trata principalmente de una alteración focal.

Hemos detectado la deleción del gen *CDKN2A* (región cromosómica 9p21.3) en casi la mitad de los carcinosarcomas estudiados en nuestra serie (46,7% de los casos); de los 28 tumores que han demostrado pérdida génica, en 6 de ellos (21,4%) hemos encontrado deleción en homocigosis. El gen *CDKN2A* codifica dos proteínas, p14ARF y

p16; la primera participa en las vías de señalización ARF-MDM2-p53 y Rb-E2F1 y actúa como inhibidor fisiológico de MDM2, una ligasa que controla a su vez la actividad y estabilidad de p53 participando, por tanto, en el control del ciclo celular, activando la parada de las células en fase G2 e induciendo la apoptosis. p16 interacciona con la proteína Rb y controla la transición de la fase G1 a S del ciclo celular; se une a la proteína CDK4/6 inhibiendo su actividad cinasa, previniendo la fosforilación de Rb1 y bloqueando la transcripción de los genes regulados por el factor de transcripción E2F1. Regulando estos pasos cruciales del ciclo celular, p16 es capaz de mantener el estado de senescencia celular y la supresión tumoral induciendo una parada irreversible en el ciclo celular. Su inactivación, por lo tanto, puede resultar ser un evento crucial en la carcinogénesis de distintos tumores y esto se puede producir principalmente por mutaciones, deleciones y silenciamiento génico. Las mutaciones se han descrito principalmente en melanomas familiares, cáncer de páncreas y desordenes linfoproliferativos, mientras que las deleciones en hemi- y/o homocigosis son eventos más comunes en glioblastomas, melanomas esporádicos y mesoteliomas [196, 197]. La alteración más frecuente descrita en los carcinomas de endometrio es la hiper-metilación aberrante del promotor del gen *CDKN2A* [198, 199] y a diferencia del perfil de expresión de la proteína p16, que resulta de gran utilidad en la clasificación de los carcinomas serosos frente a los CEE, no existe una clara correlación entre la alteración epigenética y uno u otro subtipo histológico. La presencia de deleción en los carcinosarcomas no se ha descrito previamente, a excepción del trabajo realizado por Cherniack et al., que detectaron deleción de los genes *CDKN2A* y *CDKN2B* en homocigosis en 2 de los 57 tumores analizados (3,5%); estos autores también describen pérdida de copias somáticas de la región 9p23 en el 59,6% de las muestras (34 de 57 CS), región situada a 7,9 Mb de la región 9p21.3. Los tumores sólidos, como los glioblastomas y los mesoteliomas, que presentan deleción en homocigosis suelen ser neoplasias más agresivas e indiferenciadas asociadas a peor pronóstico. Los 5 CS positivos en nuestra serie para este tipo de alteración eran tumores con diferenciación endometriode para el componente epitelial y diferenciación heteróloga para el componente mesenquimal (3 casos con componente de rabdomiosarcoma, uno condroide y otro mixoide); este tipo de asociación no resultó estadísticamente significativa, posiblemente debido al escaso número de tumores con deleción en homocigosis. La concordancia entre ausencia de expresión de la proteína p16 y deleción en homocigosis fue observada en cuatro de los cinco casos; el restante caso resultó ser no valorable para el marcador inmunohistoquímico.

Junto al locus génico 9p21 hemos analizado las aneusomías del cromosoma 9, identificando trisomías y/o polisomías en el 20% de los CS evaluables para estas alteraciones (12 de 60 casos) y como en el caso del cromosoma 10, no hemos observado monosomía. Los datos presentes en la literatura y en la base de datos Cancer Genome Anatomy Project (<https://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) sobre las anomalías numéricas relacionadas con el cromosoma 9 y los tumores del cuerpo uterino, indican que las trisomías están presentes en el sarcoma del estroma endometrial (dos casos) y las monosomías se han encontrado en únicamente tres casos de carcinoma de endometrio.

La delección en heterocigosis del gen *CDKN2A*, como único evento molecular, afectante a la unidad génica funcional, no tiene una repercusión directa sobre el nivel de expresión de la proteína p16; su repercusión molecular se basa sobre todo en la posible pérdida de heterocigosidad del alelo nativo, produciendo pérdida completa de la expresión de la proteína funcional. Hemos analizado si existía una posible correlación entre la expresión proteica nuclear de p16 y la presencia de delección génica y no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativa. Los mecanismos responsables del acumulo nuclear de la proteína residen probablemente en otros factores que controlan directamente o indirectamente su sobreexpresión en las células tumorales, como por ejemplos alteraciones en la correcta funcionalidad de CDK4 o de la ciclina D, ambas responsables del secuestro y degradación de p16.

Hemos analizado la presencia de dos alteraciones específicas de locus (genes *TP53* y *ERBB2*) así como las posibles alteraciones numéricas del cromosoma 17. Hemos observado pérdida en heterocigosis del locus génico 17p13.1 (*TP53*) en el 42,1% de las muestras (24 de 57 CS) y ninguna alteración relevante para el locus 17q12 (*ERBB2*). El gen *TP53* se encuentra alterado en más del 50% de todas las neoplasias humanas principalmente debido a mutaciones puntuales que alteran la correcta funcionalidad de la proteína y en muchas ocasiones influyen directamente sobre su tiempo medio de vida y la capacidad de ser degradada y regulada de forma eficiente. La delección del locus 17p13 se ha descrito principalmente en neoplasias hematológicas, como la leucemia linfóide crónica donde está ampliamente demostrado su significado pronóstico, siendo más desfavorable en presencia de mutación o pérdida del gen *TP53*. La alteración del correcto funcionamiento de esta proteína produce alteración en el control del ciclo celular, mecanismos de evasión de la apoptosis y afecta directamente a la integridad cromosómica, aumentando el riesgo de roturas en las regiones relacionadas con la

heterocromatina [200]. Las mutaciones puntuales se han descrito en distintas series de carcinosarcomas uterinos [145, 171, 201], muchas de las cuales han sido previamente descritas en otros carcinomas endometriales con un significado funcional conocido; la presencia de delección de esta región no se había demostrado previamente en los CS: los resultados de la serie analizada por el TCGA indican alguna pérdida a nivel somático de la región 17p13.1, aunque destacan que el gen *TP53* no se encuentra significativamente alterado [171]. Nuestro estudio sí evidencia que el *locus* específico de este gen está alterado en los CS y la discrepancia podría razonablemente depender de la diferente metodología empleada por el TCGA (secuenciación masiva) frente a la que hemos utilizado en nuestro estudio (FISH), permitiendo esta última ver las anomalías directa y únicamente en las células neoplásicas de interés.

Hemos analizado la existencia de una posible correlación entre las alteraciones numérico-estructurales detectadas para el gen *TP53* y la sobreexpresión de su correspondiente proteína, que hemos observado en el 67,1% de los casos (51 de 76 CS), sin hallar ninguna asociación estadísticamente significativa, debido a que la tinción nuclear positiva se observó en aquellas muestras que demostraron tanto pérdida como aumento en el número de copias génicas ligado a aneusomía del cromosoma 17 (trisomía y polisomías), detectadas en el 36,2% de los casos.

Hemos detectado la presencia de ganancia o amplificación del gen *CCND1* (región cromosómica 11q13.3) en el 40,3% de las muestras: presencia de 3 a 4 copias génicas en el 29,8% de los casos y 5 o más copias en el 10,5% de las muestras (17 y 6 tumores respectivamente de 57 casos evaluables). No existen datos en la literatura sobre la amplificación del gen *CCND1* en los CS y los resultados obtenidos por el TCGA demuestran presencia de amplificación para las regiones 11q13.1, 11q13.2 y 11q13.5 en 17 de los 57 tumores analizados (29,8%), sin evidenciar alteración en el *locus* génico que codifica para la ciclina D1. No podemos excluir que la detección de 3 a 4 señales observadas en alrededor del 30% de los casos no esté relacionada con trisomía o polisomía del cromosoma 11 más que a una verdadera ganancia génica; esto se debe a una limitación de la técnica, ya que hemos realizado el estudio de esta región mediante una sonda específica de *locus* sin tener una sonda centromérica de control del cromosoma 11. La amplificación del gen *CCND1* es un hallazgo molecular descrito frecuentemente en cáncer gástrico, de mama y en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, pero resulta ser un evento muy poco frecuente en los carcinomas de endometrio, con una frecuencia

que oscila entre el 2-4%, según la serie estudiada. El estudio de asociación entre el perfil de expresión nuclear de la proteína ciclina D1 y la presencia de ganancia/amplificación génica no ha evidenciado ninguna correlación estadísticamente significativa, indicando que otros mecanismos moleculares son responsables de la sobreexpresión proteica evidenciada en los tumores estudiados en nuestra serie. Esta falta de correlación se ha descrito también en los cánceres de endometrio y mama.

Las mutaciones puntuales descritas para el gen *EGFR* se asocian a mayor sensibilidad al tratamiento con los inhibidores tirosin-quinasas en los carcinomas no microcíticos de pulmón, mientras que la correlación entre sobreexpresión proteica del receptor EGFR en la superficie de la membrana celular y presencia de amplificación génica sigue siendo algo controvertido en neoplasias como cáncer de colon o cáncer de pulmón, sugiriendo un mecanismo diferente al que se suele observar para el receptor HER2 en cáncer de mama. Nuestro trabajo ha sido el primero en analizar la presencia de ganancia o amplificación del gen *EGFR* en una larga serie de CS detectando una de estas alteraciones en el 33,3% de los casos estudiados: 11 tumores han resultado positivos para ganancia génica (14,1%) y 15 muestras (19,2%) para amplificación de los 78 casos evaluables. Hemos analizado si existía alguna relación entre la expresión de membrana del receptor EGFR y la presencia de ganancia/amplificación y hemos encontrado esta asociación en el 15,8% de los tumores estudiados. La ausencia de anomalías génicas en los restante casos positivos para la inmunotinción de membrana es un hallazgo que se ha descrito en otras ocasiones en la literatura [141, 177] e indica la existencia de otros mecanismos implicados durante la transcripción y la transducción de la secuencia proteica o la formación de proteínas truncadas o no funcionales. Analizamos también las alteraciones numéricas del propio cromosoma 7, encontrando presencia de trisomía o polisomía en el 23,1% de los casos (18 de 78 de las neoplasias). La ganancia del cromosoma 7 es un hallazgo detectado en otros tumores del cuerpo uterino: según la base de datos Cancer Genome Anatomy Project sería una alteración descrita en 20 casos de carcinomas y 5 casos del sarcoma del estroma endometrial junto con los resultados publicados por Micci et al. donde se evidenciaba que la ganancia 7p y 7q eran eventos más característicos de CEE [123].

La amplificación del oncogen *MYC* (región cromosómica 8q24.21) es un evento descrito frecuentemente en los cánceres de mama, ovario y próstata, en neoplasias hematológicas (leucemias y linfomas), en tumores de partes blandas (angiosarcomas post-

radioterapia) y en tumores pediátricos (meduloblastomas); en todas estas neoplasias se suele asociar a peor pronóstico, resistencia a tratamiento y tumores más indiferenciados y agresivos. La proteína c-myc actúa como factor de transcripción y participa en la regulación del ciclo celular, la proliferación y diferenciación celular, apoptosis e inmortalización. Las alteraciones que alteren su correcto funcionamiento y que produzcan su sobreexpresión proteica (por reordenamiento génico o amplificación) contribuyen directamente a la transformación neoplásica y promueven la inestabilidad cromosómica, especialmente induciendo aneuploidías debido a fallos en determinados puntos de control del ciclo celular. Hemos detectado en nuestra serie 13 de 65 CS positivos para amplificación del gen *MYC* (20% de casos), una frecuencia acorde a los datos obtenidos por el TCGA (23,2%) [171]. Schipf et al. analizaron una serie de 30 CS de útero y ovario, describiendo un porcentaje de 23 casos positivos (78%). Los autores observaron también una alta frecuencia de ganancia del brazo q del cromosoma 8 en su serie (42% de tumores) [142]; resultados análogos fueron obtenidos previamente por Micci et al., destacando que este tipo de trisomía parcial era una de las ganancias más frecuentes de los CS analizados en su serie alcanzado el 80% de casos positivos [123]. Nuestros resultados evidencian trisomía o polisomía del cromosoma 8 en el 26,5% de las muestras (18 de 68 casos), hallazgos descritos previamente en un trabajo realizado sobre 3 CS, donde las alteraciones numéricas del cromosoma 8 (polisomía y tetrasomía) se detectaron en el 100% de los casos [202].

Alteraciones de los genes *MYCN* y *ALK* (regiones cromosómicas 2p24.3 y 2p23.2 respectivamente) dependientes de las alteraciones numéricas del cromosoma 2 se han observado en nuestra serie en el 21,7% de los casos (15 de 69 muestras evaluables): todos los casos con 3 o 4 copias de ambos genes eran portadores de trisomías y/o tetrasomías del cromosoma 2. La trisomía del cromosoma 2 es un evento que se ha descrito en algunas series de carcinomas de endometrio, por un total de 13 casos descritos en la base de datos CGAP (<https://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>) pero que no se había detectado previamente en los CS [123, 142, 203].

Inestabilidad cromosómica y genómica

Está claramente establecido que una enorme inestabilidad genómica subyace a la gran mayoría de tumores en distintos niveles y con magnitudes diferentes; así mismo,

también está ampliamente demostrado que este proceso, que se produce durante las primeras fases de la expansión clonal maligna, aumenta la tasa de mutaciones espontaneas y facilita la adquisición de nuevas alteraciones genéticas [153]. En las últimas décadas, los estudios de secuenciación masiva realizados a gran escala han intentado caracterizar las alteraciones más recurrentes en los genomas de las células neoplásicas y, a pesar del elevado número de anomalías identificadas, la mayoría de las alteraciones se producen en un escaso número de genes que suelen estar mutados, deletados o amplificados a pesar de las distintas patologías estudiadas. Se ha demostrado que, en general, los tumores epiteliales suelen ser más inestables a nivel genómico, debido a la alta tasa de mutaciones puntuales, inestabilidad de microsatélites y cromosómica, que las neoplasias hematológicas y mesenquimales, que se suelen caracterizar principalmente por reordenamientos génicos en *loci* concretos frente a una afectación más generalizada de todo el genoma [204]. Los agentes exógenos, como el tabaco o en el caso de los tumores endometriales, las terapias hormonales y la dieta, pueden alterar este tipo de correlación induciendo mutaciones génicas y epigenéticas.

Las bases moleculares de la inestabilidad genómica están bien demostradas en los cánceres hereditarios ligados a mutaciones en los genes que codifican las proteínas reparadores del ADN o responsables del control del ciclo celular, de la apoptosis o de la proliferación (*BRCA1/2*, *MLH1*, *MSH2/6*, *TP53*, etc.), pero no sucede así con los tumores esporádicos. Las limitaciones asociadas a su comprensión se deben a la heterogeneidad genómica presente entre los distintos tipos de tumores y la capacidad de las herramientas moleculares en medir y detectar correcta y simultáneamente tanto el estado como el nivel de inestabilidad de una determinada neoplasia [156].

Analizamos cuantos de los tumores presentes en nuestra serie de CS podrían ser considerados inestables a nivel cromosómico, habiendo demostrado que ninguno de ellos presentaba inestabilidad de microsatélites. Para ello, definimos como muestras CIN-positivas aquellos casos que eran simultáneamente aneuploides y con un número de alteraciones superior a 3 (observamos un único caso aneuploide con dos alteraciones) y analizamos si existía correlación estadísticamente significativa entre el número de alteraciones y la condición de aneuploidía. El 73.1% de los CS demostraron ser aneuploides (57 de 78 casos), siendo las alteraciones numéricas detectadas principalmente trisomías y polisomías ($n \geq 4$), tal como ha sido comentado anteriormente. El 91% de las muestras (51 de 57 casos) demostraron ser inestables a nivel cromosómico,

observándose en la mayoría de ellas de 5 a 8 alteraciones numéricas y/o estructurales y el análisis de correlación entre el número de alteraciones y la condición de aneuploidía resultó estadísticamente significativo con un *p-valor* inferior a 0.001.

Definimos como tumores con Inestabilidad Genómica aquellas neoplasias que eran simultáneamente positivas para al menos una mutación puntual, una alteración estructural y una alteración numérica [156]. En base a estos criterios, 9 de los 15 casos (60%) para los cuales disponíamos de todas estas informaciones se podrían considerar como tumores con Inestabilidad Genómica, siendo 3 de ellos tumores con un número de alteraciones superior a 5 y con aneusomía detectada en más de dos cromosomas. Nuestros resultados indican, por lo tanto, que los CS son tumores claramente aneuploides con una alta inestabilidad cromosómica y genómica.

La aneuploidía es una condición genómica que puede originarse de un único error en la segregación mitótica durante la transformación maligna, que posteriormente dará lugar a una expansión clonal de un cariotipo aneuploide no-CIN-dependiente. En estos casos, el tumor suele ser aneuploide de forma homogénea mientras que en las neoplasias con CIN se observa normalmente una alta heterogeneidad molecular (numérica y estructural) intra-tumoral. Hemos observado este grado de heterogeneidad en los CS presentes en nuestra serie a través de los estudios de hibridación *in situ*: tanto las alteraciones numéricas como las estructurales estaban presentes en porcentajes diferentes dentro del propio tumor; los tumores claramente polisómicos presentaban en muchas ocasiones de 4 a 7 cromosomas; las amplificaciones o las deleciones estaban presentes en más del 50% de las células tumorales estudiadas pero, en función de la muestra, este porcentaje podía alcanzar la totalidad de los núcleos evaluados. En el caso de las amplificaciones, hemos observado células con ganancia génica, con baja amplificación o con alta amplificación dentro del mismo tumor y del mismo componente histológico con un grado de heterogeneidad molecular parecido a lo que se suele observar en los carcinomas gástricos o de mama para las alteraciones del gen *ERBB2* (HER2). En el caso de las deleciones, los tumores que presentaban pérdida génica en homocigosis también presentaban células con deleción en heterocigosis, indicando como estos procesos habían sido secuenciales durante la expansión clonal. La Inestabilidad Cromosómica confiere una presión selectiva sobre la evolución tumoral y se asocia a un aumento de la capacidad de metastatizar de las neoplasias, así como se asocia a la resistencia adquirida a las terapias convencionales.

La elevada Inestabilidad Genómica observada es un hallazgo que encaja perfectamente con el conjunto de alteraciones que hemos detectado en este estudio y también con los datos presentes en la literatura. Los trabajos de secuenciación masiva realizados para caracterizar el perfil mutacional de este tipo de neoplasia indican que las mutaciones del gen *TP53* son las alteraciones más frecuentemente detectadas en los CS [145, 146, 171, 201]. Este dato, junto con nuestros resultados de sobreexpresión nuclear de la proteína p53 en un elevado porcentaje de muestras, así como la sobreexpresión de la proteína p16, la presencia de deleciones en homocigosis, tanto del gen *CDKN2A* como del gen *PTEN*, las amplificaciones de los genes *MYC* y *EGFR* en unión con las mutaciones del gen *PIK3CA*, son eventos moleculares que contribuyen a instaurar y mantener un estado de inestabilidad de todo el genoma, tanto a nivel génico como cromosómico. La presencia concomitante de mutaciones del gen *TP53* y amplificaciones del gen *MYC* se ha asociado en el cáncer de mama a un aumento de la aneuploidía observada en los tumores más agresivos y de peor pronóstico [205], así como la amplificación del gen *EGFR*, las deleciones de los genes *PTEN* y *TP53* se asocian a elevado niveles de aneuploidía en los glioblastomas, principalmente en los que son más indiferenciado y de comportamiento más agresivos [206].

Nuestros resultados están acordes con los datos presentes en la literatura sobre la elevada aneuploidía e inestabilidad cromosómica y genómica detectada en los CS. Los trabajos publicados por Micci et al., Schipf, et al., Gunawan et al. y Kounelis et al. [123, 138, 142, 202] destacan en sus series el elevado número de casos que han demostrado presencia de distintas alteraciones cromosómicas, bien segmentarias, afectando a regiones concretas, o bien totales, interesando a los brazos cortos o largos de los distintos cromosomas. Hay que destacar que todos estos trabajos, junto a nuestros resultados, indican que la elevada inestabilidad observada en los CS no parece ser un proceso que afecta a todo el genoma de las células neoplásicas indistintamente, sino que existen *loci* génicos, regiones y cromosomas principalmente involucrados en el proceso carcinogénico o de expansión clonal de este tipo de neoplasia. Este dato resulta contrapuesto a lo que Cherniack et al. describen en su trabajo; según estos autores, el análisis de ploidía y de duplicación de todo el genoma realizada en su serie de 57 CS, mediante el uso del algoritmo ABSOLUTE [207] indicaría que el 90% de los tumores ha sufrido al menos un evento de duplicación de todo el genoma [171]. Inferir el número absoluto de copias génicas y cromosómicas es un proceso complicado por distintas

razones: las células tumorales están entremezcladas con una fracción desconocida de células normales acompañantes; el valor real de ploidía de las células tumorales normalmente se desconoce; la población de células tumorales suele ser heterogénea debido sobretodo a los distintos subclones que constituyen el tumor. Este tipo de algoritmo se ha creado para los distintos estudios realizados por el TCGA. Si los resultados de Cherniack et al. fueran ciertos, deberíamos haber detectado un mayor número de casos positivos para tri- y tetrasomías de los cromosomas analizados y una mayor tasa de ganancia génica para los distintos *loci* estudiados y, sin embargo, hemos observado aneusomías en el 18-37% de las muestras analizadas. Consideramos que nuestros resultados pueden representar una aproximación más realista de la inestabilidad cromosómica que sufren estos tumores, simplemente por el tipo de abordaje metodológico utilizado en nuestro estudio como es la hibridación *in situ*.

Posibles implicaciones terapéuticas

Hemos de destacar que todos los trabajos presentes en la literatura se han centrado o bien en el perfil mutacional o bien en el análisis citogenético por separado de los CS, pero ninguno de ellos, a excepción de éste y el realizado por el propio TCGA, han analizado en paralelo en una serie tan grande las mutaciones puntuales y las alteraciones cromosómicas, obteniendo una imagen más exhaustiva de la complejidad molecular que subyace a estas neoplasias. Estos resultados nos ofrecen un interesante abanico de posibles dianas terapéuticas para futuros abordajes de tratamientos fármaco-dirigidos; en la actualidad, el tratamiento de elección para estas neoplasias consiste en la intervención quirúrgica (histerectomía total, anexectomía bilateral, linfadenectomía pélvica y paraórtica, omentectomía y exéresis de todas las lesiones existentes a nivel abdominal) seguida de radioterapia y quimioterapia sistémica junto con el uso combinado adyuvante de ifosfamida y paclitaxel en el tratamiento en primera línea del carcinosarcoma uterino, así como en la enfermedad recidivante. A pesar de esto, la tasa global de supervivencia a los 5 años es del 30% sobre todo debido a que en más de un tercio de los casos el diagnóstico se realiza en estadios avanzados, empobreciendo todavía más las expectativas de supervivencia. Identificar posibles dianas terapéuticas representaría una alternativa al tratamiento convencional de estas neoplasias, mejorando posiblemente la tasa de supervivencia de las pacientes afectas, como ha ocurrido para otros tumores como el

carcinoma de pulmón, de mama o colorrectal, entre otros. Hemos revisado, por un lado, los datos presentes en la literatura sobre los posibles inhibidores que se podrían utilizar en función de las alteraciones detectadas en los CS estudiados (tabla n. 18) y, por otro, los ensayos clínicos disponibles a día de hoy presentes en la base de datos *clinicaltrials.gov*.

Tabla 18. posibles dianas terapéuticas para el tratamiento fármaco-dirigido de los CS.

Tratamiento	Gen	Frecuencia
Sensibilidad a los inhibidores de PI3K	PIK3CA	6/34 (17%)
	PTEN	5/73 (6,8%)
Sensibilidad a los inhibidores de CDK	CDKN2A	6/60 (10%)
	CCND1	6/57 (10,5%)
Sensibilidad a imatinib/sunitinib	PDGFRA	4/34 (11.7%)
	KIT	2/34 (5.9%)
Sensibilidad a vemurafenib/dabrafenib	BRAF	1/34 (2.9%)
Sensibilidad a los inhibidores anti-EGFR	EGFR	2/34 (5.9%)
Sensibilidad a los inhibidores anti-MET	MET	2/34 (5.9%)
Sensibilidad a los inhibidores de mTOR	AKT	1/34 (2.9%)

Las alteraciones detectadas podrían conferir sensibilidad al tratamiento con al menos 7 clases de inhibidores, algunos de los cuales están siendo ampliamente utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de otras neoplasias como son el imatinib/sunitinib (LLC, GIST, dermatofibrosarcoma protuberans) o el vemurafenib (melanoma metastásico) y el dabrafenib (melanoma metastásico y carcinoma de pulmón). Los inhibidores de PI3K y de CDK disponibles actualmente están principalmente asociados a ensayos de fase II y III y en muchas ocasiones no son moléculas que van específicamente dirigidas frente a los genes *PIK3CA* o *CDKN2A*.

En la base de datos *clinicaltrials.gov* para los pacientes con CS, aparecen 40 ensayos presentes, muchos de ellos concluidos (26 de 40); de todos ellos, sólo 9 se han centrado en el tratamiento basado en anticuerpos monoclonales (bevacizumab) o inhibidores específicos (imatinib, sunitinib, pazopanib) pero para ninguno era indispensable conocer el perfil mutacional para poder acceder al reclutamiento. Creemos, en base a los resultados que hemos obtenido, que distintos pacientes podrían beneficiarse de un tratamiento fármaco-dirigido a pesar de la baja frecuencia detectada para algunas

mutaciones y que estas nuevas estrategias farmacológicas podrían mejorar la supervivencia de las pacientes afectas por este tipo de patología.

Posibles diferencias moleculares entre el componente epitelial y mesenquimal de los carcinosarcomas.

Los CS se pueden considerar como buen ejemplo de ese conjunto de eventos celulares que permiten la conversión de células epiteliales a mesenquimales o con capacidad de migración y desplazamiento, proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM). Estos cambios conllevan pérdida de polarización celular y de contactos célula-célula, reorganización del citoesqueleto, expresión de marcadores mesenquimal y, por último, adquisición de un fenotipo migratorio. La TEM que se produce en las células de los carcinomas durante el proceso de invasión y metástasis se desencadena por la activación de distintas cascadas celulares oncogénicas que normalmente producen una sobreexpresión de los represores transcripcionales de la cadherina-E, como por ejemplo Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 y Twist [31, 147-149]. Debido a esta pérdida progresiva de cadherina-E se produce un fenómeno conocido como cambio de cadherina que consiste en el aumento de expresión de la cadherina-N y la cadherina-11. Las células también expresan marcadores mesenquimales como la vimentina, la fibronectina, la osteonectina (SPARC) y otros [31, 149]. Los datos actuales presentes en la literatura apoyan, por un lado, que el componente epitelial y el mesenquimal presente en los CS provengan de una misma célula progenitora gracias a los estudios de clonalidad comentados previamente y, por otro, que las diferencias histológicas observadas se deban en buena parte a la TEM [148, 149, 152]. Para aportar ulteriores datos a favor de la teoría clonal así como para evidenciar si la transición epitelio-mesénquima podía estar influenciada por alguna alteración cromosómica numérica o estructural, decidimos analizar si existía diferencia en el tipo de anomalías observadas entre ambos componentes histológicos y en función de la histología predominante tanto del componente epitelial como del componente mesenquimal de los carcinosarcomas.

No observamos diferencias entre el componente epitelial y mesenquimal en el patrón de alteraciones estructurales y numéricas estudiadas en nuestras muestras: tanto uno como el otro componente mostraron el mismo nivel de aneuploidía y/o de deleciones y ganancias. Observamos grados distintos de heterogeneidad intratumoral que iban

aumentando en función de si la muestra resultaba ser aneuploide y de si presentaba un elevado número de alteraciones totales tal y como hemos discutido previamente. A diferencia de la mayoría de los trabajos presentes en la literatura, sobre los posibles desajustes entre el perfil inmunohistoquímico y mutacional entre los dos componentes histológicos de los CS, pocos estudios se han centrado en comparar la presencia de las mismas alteraciones cromosómicas en el componente epitelial y mesenquimal de estos tumores. Los estudios para investigar estas anomalías moleculares han sido realizado principalmente mediante matrices de hibridación genómica comparada (*aCGH*), con o sin análisis por separado de los dos componentes previa microdissección [123, 142]; otros trabajos han utilizado técnicas de citogenética convencional mediante cultivo celular de material obtenido de los propios tumores [202, 203, 208] pero sólo dos de ellos se han realizado mediante hibridación *in situ* con fluorescencia [125, 142] y ninguno de ellos ha analizado un amplio número de *loci* génicos y cromosomas como en este trabajo. Independientemente de la metodología utilizada, nuestros resultados están en consonancia con los datos presentes en la literatura, apoyando ulteriormente la teoría de conversión y del origen clonal de ambos componentes. La mayoría de los trabajos revisados concuerdan en que no existen diferencias sustanciales entre las alteraciones cromosómicas observadas en uno u otro componente, aunque en los trabajos de hibridación genómica comparada uno de los principales sesgos introducidos pueda haber sido estudiar el ADN extraído sin diferenciar entre uno u otro componente, así como se evidencia en el trabajo de Schipf et al.; estos autores hacen también hincapié que dos de los principales hallazgos detectados mediante esa herramienta se confirmaron a través de hibridación *in situ*, principalmente para dos regiones génicas (8q24.12 y 20q13.2) para las cuales habían observado amplificación: la región donde reside el gen *MYC* resultó más amplificada en el componente epitelial mientras que la otra resultó igualmente alterada en ambos componentes sin distinción alguna [142]. Los datos obtenidos del trabajo realizado por el TCGA son también acordes a nuestras observaciones, tanto para el perfil mutacional como para las anomalías cromosómicas. Cherniack et al. remarcan que obtuvieron el mismo perfil de alteraciones en el componente epitelial y en el mesenquimal previamente microdisecados y debido a esto, los autores sugieren que estos resultados evidencian un origen epitelial de la neoplasia así como otros autores habían descrito previamente [17, 146, 171, 201].

Posibles diferencias en las alteraciones moleculares de los CS dependiendo de la histología endometrioide o serosa del componente epitelial.

Analizamos si existían diferencias entre las anomalías detectadas en tumores cuyo componente epitelial era de tipo endometrioide versus no endometrioide y observamos que las ganancias de los genes *ALK* y *MYCN* junto con la aneusomía del cromosoma 2 estaban presentes en el 34,6% de los casos (9 de 26) con diferenciación no endometrioide frente al 13,2% de las muestras (5 de 38) con fenotipo endometrioide, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. La ganancia y/o amplificación del gen *CCND1* fue la otra alteración estructural que observamos diferencias estadísticamente significativas, ocurriendo hasta en el 60% de los tumores (12 de 20) en el componente epitelial con diferenciación no endometrioide, frente a un 29% de los casos con morfología endometrioide (9 de 31). Micci et al. no encontraron grandes diferencias entre los carcinosarcomas con diferenciación endometrioide, que demostraron ganancias del brazo q de los cromosomas 1 y 8, frente a los tumores con diferenciación no endometrioide, en los cuales detectaron las mismas alteraciones junto con la ganancia del brazo p del cromosoma 5 [123]. Resultados análogos se obtuvieron con el trabajo de Schipf et al., los cuales no observaron diferencias entre el tipo de diferenciación epitelial y el tipo de alteraciones encontradas: la presencia de amplificación de cromosoma 8, fue un hallazgo detectado en el 54% y 62% de los casos con diferenciación endometrioide y no endometrioide respectivamente [142].

Posibles diferencias en las alteraciones moleculares de los CS dependiendo de la histología endometrioide o serosa del componente epitelial.

Analizamos si existían diferencias entre las anomalías detectadas en tumores cuyo componente mesenquimal presentaba diferenciación homóloga versus la heteróloga, sin observar en este contexto ninguna alteración predominante en uno de los dos subtipos morfológicos. Los datos presentes en la literatura, son acordes a nuestros resultados y en general no hay datos que apoyen que una alteración sea más específica de la diferenciación homóloga o de la heteróloga. El único trabajo que detecta algunas ligeras diferencias indica que la ganancia de las regiones 1q31-q41 y 8q23-q24 se detectó en todos los casos con diferenciación homóloga mientras que los tumores que presentaban

una diferenciación heteróloga demostraban principalmente ganancia de las regiones 8p11-p21, 8q11-q22, 1q22-q24 y 1q32 [123].

Diferencias en las alteraciones moleculares entre los carcinosarcomas y otros subtipos histológicos del carcinoma de endometrio de mal pronóstico.

Nos propusimos averiguar si los CS presentaban características moleculares específicas que los pudiesen distinguir del resto de tumores endometriales, debido a que las alteraciones estudiadas en nuestra serie son eventos moleculares que subyacen a otros tipos de carcinomas de endometrio. Elegimos por esta razón una serie de 73 carcinomas de endometrio de alto grado constituida por 39 Carcinomas Serosos (CNE), 18 Carcinomas Endometrioides Grado 3 (CE) y 16 Carcinomas Indiferenciados (CI). Se analizaron los distintos tipos de alteraciones cromosómicas tanto estructurales (a) como numéricas (b) estudiadas en los CS y también la expresión de 5 marcadores inmunohistoquímicos: p53, ciclina D1, BAF-250, MLH1 y MSH2.

La media de alteraciones cromosómicas observadas fue de 3.74 (SD \pm 2.91), 3.06 (SD \pm 2.22) y 2.86 (SD \pm 3.46) para los CNE, CE y CI, respectivamente. La aneuploidía se detectó en 16 de los 38 CNE, en 5 de los 17 CE y en 5 de los 14 CI (42%, 29,5% y 35.2% de los casos, respectivamente). Estos datos, comparados con los resultados comentados previamente para los CS (media de alteraciones de 4.26 (SD \pm 2.64) y aneuploidía detectada en 73.1% de los casos), demuestran claramente que los CS son neoplasias más aneuploides que los otros subtipos de carcinomas endometriales de alto grado. Los carcinomas serosos presentes en nuestra serie resultan también ser tumores que durante la expansión clonal sufren distintas alteraciones cromosómicas y que presentan un nivel de aneuploidía elevado, datos acordes a las evidencias científicas presentes en la literatura [209] y que, como hemos comentado previamente, se deben al elevado porcentaje de casos que sufren alteraciones en el gen *TP53*, hallazgo responsable de la alta inestabilidad genómica en ellos presente.

Los CE (FIGO grado 3) constituyen un grupo heterogéneo ~~grupo~~ de tumores que presentan histología, alteraciones moleculares y evolución clínica variable. El prototipo de este tipo de neoplasia se debería poder diagnosticar de forma reproducible simplemente con el análisis histopatológico de la lesión, pero, debido a que un 30-50% de

los casos no presenta una morfología característica, el diagnóstico final no resulta siempre reproducible, con una alta tasa de variabilidad interobservador [33, 210]. Los CI representan un subtipo histológico muy poco frecuente pero altamente agresivo de cáncer de endometrio, con una frecuencia estimada alrededor del 9% de todos los carcinomas de endometrio [211]. Este subtipo histológico se caracteriza por células de tamaño mediano o grande, patrón difuso de crecimiento y ausencia de diferenciación glandular, papilar, escamosa o neuroendocrina y, a menudo, puede ser erróneamente diagnosticado como carcinoma endometriode grado 3 [212]. Los carcinomas indiferenciados de endometrio se caracterizan por pérdida de expresión de los marcadores epiteliales tales como queratinas, cadherinas y mir-200, pero suelen expresar ZEB-1, represor funcional de la cadherina-E [160, 213].

Los datos presentes en la literatura sobre la caracterización molecular de los carcinomas endometrioides grado 3 son escasos y se han centrado principalmente en la búsqueda de mutaciones puntuales (genes *TP53*, *KRAS*, *PTEN*, *PIK3CA*, etc.) o alteraciones cromosómicas (genes *CCND1*, *ERBB2*, etc.) características de otros subtipos histológicos, que pudiesen ayudar a caracterizar de manera más certera esta entidad, debido a que uno de los principales retos diagnósticos reside en poder diferenciarlos correctamente de los carcinomas serosos [210, 214]. Al igual que los carcinomas de endometrio grado 3, los datos sobre las características moleculares de los CI son escasos, sobre todo debido a la casuística reducida de esta entidad. Los resultados que hemos obtenido relacionado con el número medio de alteraciones y el grado de aneuploidía nos indican que los CI son tumores que podrían situarse entre los carcinomas serosos y los endometrioides de alto grado por el nivel de inestabilidad cromosómica observada.

La monosomía del cromosoma 6 y la pérdida de los genes *RREB1* y *MYB* han sido los hallazgos moleculares más específicos detectados casi únicamente en los CS y previamente no descritos en ninguna otra serie. La monosomía del cromosoma 6 se ha observado en el 22,2% de los CS (12 de 54 muestras) y en ninguno de los otros carcinomas de endometrio. La pérdida de los genes *RREB1* y *MYB* se ha detectado en 12 y 15 muestras de CS de las 55 evaluables (21,8% y 27,3% respectivamente), en un único caso tanto de los 35 CNE como de los 16 CE (2,9% y 6,3% respectivamente) y en ninguno de los CI. Las diferencias observadas han demostrado ser estadísticamente significativas para todas estas alteraciones, por lo que en nuestra opinión la monosomía del cromosoma 6 podría considerarse como un hallazgo molecular característico de los

CS. Revisando los datos presentes en la literatura no hemos encontrado evidencias que las deleciones de los genes *RREB1* y *MYB* se hayan descrito previamente en los CE grado 3 y en los CI. Consultando los resultados presentes en la base de datos “www.cbioportal.org” para los 23 carcinomas de endometrio representados por CE grado 3 y mixtos, la única alteración que se describe para estos genes es la amplificación del gen *MYB* presente únicamente en 1 de 23 casos (4.35% de las muestras).

Las ganancias/amplificaciones que demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro subtipos histológicos estudiados fueron las de los genes *MYC* y *ERBB2*. Las alteraciones numéricas del gen *MYC* se observaron en 13 de 65 CS, en 1 de 12 CE y en 1 de 6 CI (20%, 8,3% y 16,7% de las muestras respectivamente) y las anomalías relacionadas con el gen *ERBB2* se detectaron en 5 de 37 CNE, 1 de 15 CE y en 1 de 13 CI (13,5%, 6,7% y 7,7% de los casos respectivamente) y en ninguno de los CS incluidos en esta serie con una diferencia estadísticamente significativas para ambas alteraciones. La ausencia de amplificación del gen *MYC* observada en los carcinomas serosos no es acorde a los datos presentes en la literatura: la frecuencia de casos que suele presentar este tipo de alteración se sitúa entre el 20-30% de las muestras en función de las series, y, en el caso específico de los 113 CNE analizados por el TCGA, la frecuencia descrita es del 26.55% (30 de 113 casos) [88]. La frecuencia observada para la amplificación del gen *ERBB2* en los CNE sin embargo es más acorde a los resultados presentes en la literatura y se sitúa entre el 20-35% de los casos (23.01% según el TCGA con 26 de 113 muestras positivas) [88, 215, 216]. Los datos sobre la amplificación de estos genes en los CE y CI en la literatura son más escasos: Álvarez et al. han descrito sobreexpresión de la proteína HER2 en 3 de 25 CE grado 3, pero sólo en uno de ellos demuestran la presencia de amplificación del gen *ERBB2* (4% de las muestras) [214]. Los datos descritos para los carcinomas de alto grado estudiados por el TCGA (no CEE y no CNEE) hablan de un 17.39% de casos con amplificación del gen *MYC* (4 de 23 muestras) y de un 13.04% de tumores con amplificación del gen *ERBB2* (3 de 23 casos). Hay que señalar que en ese trabajo no se hizo distinción entre carcinomas endometrioides grado 3 o mixtos y que los CI no fueron incluidos en el análisis [210, 212]. En nuestra serie hemos analizado por separado estas dos entidades y podríamos afirmar que nuestros resultados representan con mayor precisión la verdadera frecuencia de estas alteraciones en estos subtipos histológicos de carcinomas de endometrio.

Las alteraciones relacionadas con pérdida/delección de los genes *PTEN* y *CDKN2A* han demostrado también diferencias significativas entre los cuatro subtipos de carcinomas de endometrio. El gen *PTEN* resultó alterado en 36 de 73 CS, 9 de 32 CNE, 9 de 12 CE y 2 de 7 CI (49,3%, 28,1%, 75% y 28,6% de los casos respectivamente) siendo la alteración más frecuente detectada entre los carcinomas endometrioides grado 3. La delección del gen *CDKN2A* se ha observado principalmente en el grupo de los CS (46,7% de las muestras) y menos frecuentemente en los casos de CI. Las diferencias observadas fueron significativas tanto para el gen *CDKN2A* como para el gen *PTEN*. Tal y como se ha comentado anteriormente, las mutaciones y/o la pérdida de heterocigosidad ligada a delección génica, son eventos que se han descrito principalmente en los carcinomas endometrioides tanto de bajo como de alto grado, estos últimos caracterizados por un pequeño subgrupo de casos que podrían también demostrar presencia de mutaciones en el gen *TP53* como eventos secundarios durante el desarrollo tumoral [70, 209, 217]. Nuestros resultados evidencian que los carcinomas endometrioides grado 3 son los tumores que presentan con mayor frecuencia la delección del gen *PTEN*, mientras que los carcinomas serosos e indiferenciados presentan dicha alteración exclusivamente en un pequeño número de muestras. Los datos obtenidos por el TCGA describen una frecuencia de delección del 4.42% y 13.04% de los carcinomas serosos y alto grado/mixtos respectivamente, porcentajes que demuestran por lo tanto cierto grado de similitud a cuanto obtenido en nuestra serie. La delección del gen *CDKN2A* parece un evento casi exclusivo de los CS, ya que esta alteración no se ha descrito en otras series incluyendo los datos obtenidos por Cherniack et al. que, como se ha comentado previamente, detectan delecciones en regiones contiguas pero que no afectan directamente al *locus* génico específico de *CDKN2A* [171]. Los resultados que hemos obtenido para los otros subtipos están acordes con los escasos datos presentes en la literatura, principalmente en la base de datos *cbioportal.org* donde se describe un único caso de los 113 analizados de los carcinomas serosos (0.88% de las muestras) y ningún caso para los CE de alto grado/mixtos.

Analizamos la distribución de todas las alteraciones estudiadas entre los cuatro subtipos histológicos estudiados mediante un análisis de *cluster*. El tipo y número de alteraciones observadas no nos permitió identificar ningún patrón definido de anomalías que se pudiesen asociar de forma específica a algún grupo histológico en concreto, indicándonos que ninguna de estas alteraciones podría ayudarnos a discriminar de forma

univoca una u otra entidad. Tal y como hemos discutido anteriormente, a excepción de la monosomía del cromosoma 6 que hemos encontrado únicamente en los CS, las demás alteraciones, aunque con frecuencias distintas, se han detectado en los cuatro subtipos histológicos.

Diferencias en el patrón de alteraciones en los carcinosarcomas atendiendo a la nueva clasificación molecular del carcinoma de endometrio.

La clasificación y estratificación del riesgo de los carcinomas endometriales basada únicamente en las características histo-morfológicas sigue siendo inadecuada, debido a la alta variabilidad interobservador y a que aporta escasa información acerca de biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta a tratamiento [157, 218]. Los datos genómicos publicados por el TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) [88] apoyan una clasificación de los carcinomas de endometrio basada en cuatro subgrupos moleculares. Talhouk et al. en el año 2015 propusieron un posible algoritmo basado en el uso de cuatro marcadores como subrogados de las principales alteraciones moleculares, que permitiría replicar la clasificación del TCGA sin la necesidad de utilizar herramientas genómicas que conllevan un importante esfuerzo económico y laboral [218]. Siempre los mismos autores publicaron en el año 2016 la propuesta, seguida de su posterior confirmación en el año 2017 y la versión definitiva en febrero 2018, de una herramienta de clasificación de clara utilidad clínica llamada “PromiSe” (*Proactive Molecular Risk classification tool for Endometrial cancers*) [157, 219, 220].

El algoritmo propuesto (figura 38) se basa en: a) detección mediante inmunohistoquímica de la presencia o ausencia de expresión a nivel nuclear de las proteínas reparadoras de los apareamientos incorrectos del ADN, MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 [grupo MMR anormal (fenotipo de alta inestabilidad de Microsatélites – *MSI-high*)]; b) secuenciación del gen *POLE*; c) detección mediante inmunohistoquímica de la presencia o ausencia de expresión a nivel nuclear de la proteína p53 [grupo p53 anormal (o de variación elevada del número de copias génicas – *CNVs High*) y grupo p53 normal (o de variación baja del número de copias génicas – *CNVs Low*)].

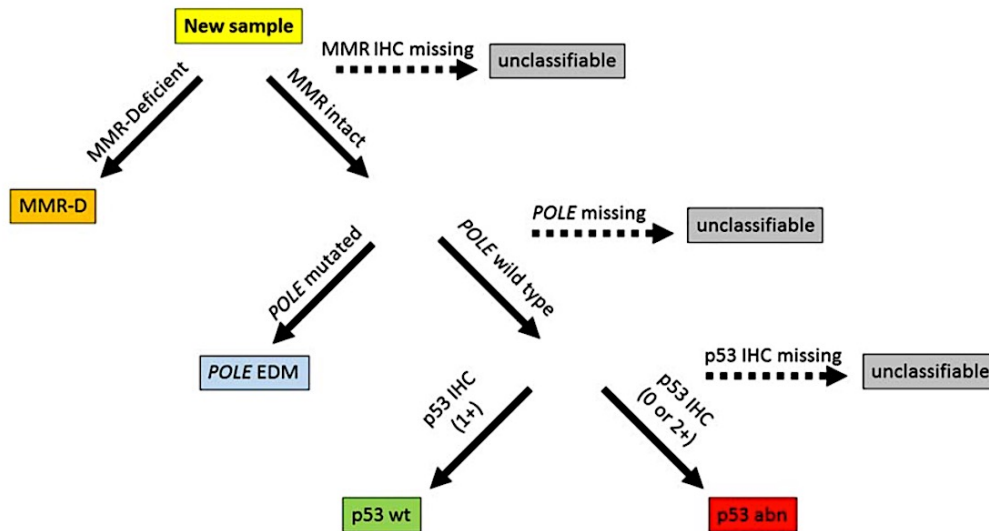


Figura 38. Versión definitiva del algoritmo propuesto para la clasificación molecular de los 4 subgrupos de carcinomas de endometrio [220].

Utilizando los datos inmunohistoquímicos y moleculares que teníamos a nuestra disposición para los CS, observamos que el 68% de las muestras eran tumores que presentaban principalmente sobreexpresión nuclear de p53 (grupo **a**, *TP53/CNV High*; 56 de 82 casos evaluables) y el restante 32% eran muestras que se podrían clasificar como CNV-Low/Otro (grupo **b**, 26 de 82 casos). Ningún caso demostró pérdida de expresión de las proteínas reparadoras (grupo **c**). Acordes a estos grupos, los datos relativos a la distribución y el número medio de alteraciones detectadas dentro de cada grupo, observamos que el grupo **a** se caracterizaba por una media de 4,67 anomalías numéricas y estructurales ($SD \pm 2,78$) y el grupo **b** con una media de valores de 3,27 ($SD \pm 2,1$). Los CS presentes en nuestra serie se agrupan principalmente como “*TP53/CNV High*”, resultado que encaja con el mayor porcentaje de casos que hemos clasificado, en otro apartado de esta discusión, con características que recuerdan a los carcinomas serosos debido a las alteraciones moleculares detectadas. McConechy et al. describen resultados análogos a los nuestros indicando que la mayoría de los tumores presentes en su serie han podido clasificarse en el grupo del subtipo molecular de los “serosos” y el restante porcentaje de casos ha demostrado características moleculares propias del subtipo molecular endometriode a excepción de tres casos con fenotipo hiper-mutado ligado a alta inestabilidad de microsatélites [146].

Utilizar el algoritmo *ProMiSe*, cuyos resultados coinciden en casi su totalidad con las propuestas formuladas por el consorcio TransPORTEC [221], permite realizar una estratificación más precisa en término de discriminación pronóstica para las pacientes afectas por carcinoma endometrial comparado con los estándares actuales basados en otros parámetros clínico-patológicos. Los resultados obtenidos por Kommoss et al. en la validación final de este algoritmo sobre una cohorte de casi 500 pacientes indican que los datos de supervivencia global (OS), supervivencia específica ligada a la patología (DSS) y la supervivencia libre de progresión (PFS) demuestra una muy buena correlación con los cuatro subgrupos moleculares sin tener en cuenta otros parámetros clínicos como el estadio. El algoritmo puede ser aplicado en las biopsias diagnósticas previas a la histerectomía, lo cual puede ser increíblemente relevante para decidir si realizar este tipo de intervención para aquellas pacientes interesadas en preservar su fertilidad o en aquellas mujeres en edad más avanzada [219]. Las características clínicas de las pacientes que pertenecen al subgrupo considerado “*TP53/CNV High*” suelen ser de edad avanzada, bajo índice de masa corpórea, tumores de alto grado y peor pronóstico mientras que los tumores que presentan mutaciones en el gen *POLE* y que suelen ser estables se asocian a mejor pronóstico y supervivencia global.

Estas observaciones son muy importantes a la hora de estratificar las neoplasias endometriales, pero extrapolando la utilidad de la clasificación molecular a nuestra serie, quizás la principal ventaja de conocer a que subgrupo pertenece un determinado CS reside en la búsqueda de dianas terapéuticas o elegir el mejor tratamiento posible. Estos tumores se detectan en paciente con edad avanzada y suelen ser de alto grado asociados a peor pronóstico (media de edad de esta serie igual a 68,86 y más de la mitad de los casos estadio III-IV), por lo que no resulta excesivamente sorprendente que hayamos podido agrupar la mayoría de ellos en el grupo “*TP53/CNV High*”. Lo más relevante de conocer si un tumor pertenece a este subgrupo molecular estaría relacionado con el mayor número de alteraciones moleculares que podrá haber sufrido durante el desarrollo y por lo tanto será proporcionalmente más fácil esperar que podamos encontrar una alteración accionable predictiva de respuesta al tratamiento. Tal y como descrito previamente, en esta serie entre un 30-40% de los tumores presentaban una posible diana terapéutica, sobre todo en los casos con un número elevado de aneusomías. Por otro lado, el haber utilizado este algoritmo, nos permite obtener una imagen más global y exhaustiva de las muestras analizadas gracias a la observación que todos los datos apoyan la eficiente

relación entre los datos clínicos-morfológicos y las características moleculares estudiadas.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos permiten concluir que:

1. Los carcinosarcomas de endometrio son neoplasias con marcada inestabilidad genómica, numerosas anomalías cromosómicas, tanto estructurales como numéricas, y alta tasa de mutaciones génicas.
2. Los carcinosarcomas estudiados en nuestra serie se caracterizan por presentar una frecuencia elevada de alteraciones en los genes *MYB* y *RREB1*, monosomía del cromosoma 6, amplificación del gen *MYC*, deleciones de los genes *PTEN* y *CDKN2A* y ganancias y amplificaciones del gen *EGFR*.
3. Las mutaciones puntuales detectadas en los genes *PIK3CA*, *KIT* y *PDGFRA*, y las alteraciones observadas para los genes *PTEN* y *CDKN2A* pueden representar nuevos biomarcadores predictivos de respuesta a tratamiento y nuevas opciones terapéuticas para este tipo de neoplasia.
4. El componente epitelial y mesenquimal de los carcinosarcomas presenta las mismas alteraciones moleculares, tanto a nivel de mutaciones puntuales como de anomalías cromosómicas, apoyando así la teoría de conversión o de metaplasia clonal. El tipo de diferenciación histológica epitelial (endometriode o no endometriode) o mesenquimal (homóloga o heteróloga) no se asocia a ninguna alteración molecular en concreto.
5. A excepción de la monosomía del cromosoma 6, no existe un conjunto de alteraciones específicas únicamente de los carcinosarcomas. La elevada aneuploidía, la inestabilidad cromosómica y el conjunto de alteraciones moleculares observadas en estos tumores demuestran unas características moleculares más próximas a las descritas en los carcinomas serosos que en los carcinomas endometrioides grado 3 o los carcinomas indiferenciados.

6. Atendiendo a la nueva clasificación molecular de los carcinomas de endometrio, los carcinosarcomas pertenecen mayoritariamente al grupo de neoplasias que demuestran alteraciones del gen *TP53* y un elevado número de copias génicas.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017.
2. Parazzini, F., *The gynaecologists' opinions*. Hum Reprod, 1997. **12**(3): p. 416.
3. Pickar, J.H., I. Thorneycroft, and M. Whitehead, *Effects of hormone replacement therapy on the endometrium and lipid parameters: a review of randomized clinical trials, 1985 to 1995*. Am J Obstet Gynecol, 1998. **178**(5): p. 1087-99.
4. Beral, V., et al., *Use of HRT and the subsequent risk of cancer*. J Epidemiol Biostat, 1999. **4**(3): p. 191-210; discussion 210-5.
5. Andersson, M., H.H. Storm, and H.T. Mouridsen, *Incidence of new primary cancers after adjuvant tamoxifen therapy and radiotherapy for early breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 1991. **83**(14): p. 1013-7.
6. Boccardo, F., et al., *Chemotherapy versus tamoxifen versus chemotherapy plus tamoxifen in node-positive, oestrogen-receptor positive breast cancer patients. An update at 7 years of the 1st GROCTA (Breast Cancer Adjuvant Chemo-Hormone Therapy Cooperative Group) trial*. Eur J Cancer, 1992. **28**(2-3): p. 673-80.
7. Cook, L.S., et al., *Population-based study of tamoxifen therapy and subsequent ovarian, endometrial, and breast cancers*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(18): p. 1359-64.
8. Fisher, B., et al., *Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(18): p. 1371-88.

9. Katase, K., et al., *The incidence of subsequent endometrial carcinoma with tamoxifen use in patients with primary breast carcinoma*. Cancer, 1998. **82**(9): p. 1698-703.
10. van Leeuwen, F.E., et al., *Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer*. Lancet, 1994. **343**(8895): p. 448-52.
11. Lu, Z. and J. Chen, *[Introduction of WHO classification of tumours of female reproductive organs, fourth edition]*. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2014. **43**(10): p. 649-50.
12. Prat, J., et al., *Endometrial carcinoma: pathology and genetics*. Pathology, 2007. **39**(1): p. 72-87.
13. Ross, J.C., et al., *Primary mucinous adenocarcinoma of the endometrium. A clinicopathologic and histochemical study*. Am J Surg Pathol, 1983. **7**(8): p. 715-29.
14. Abeler, V.M. and K.E. Kjorstad, *Serous papillary carcinoma of the endometrium: a histopathological study of 22 cases*. Gynecol Oncol, 1990. **39**(3): p. 266-71.
15. Clement, P.B. and R.H. Young, *Non-endometrioid carcinomas of the uterine corpus: a review of their pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects*. Adv Anat Pathol, 2004. **11**(3): p. 117-42.
16. Christopherson, W.M., R.C. Alberhasky, and P.J. Connelly, *Carcinoma of the endometrium: I. A clinicopathologic study of clear-cell carcinoma and secretory carcinoma*. Cancer, 1982. **49**(8): p. 1511-23.
17. McCluggage, W.G., *Malignant biphasic uterine tumours: carcinosarcomas or metaplastic carcinomas?* J Clin Pathol, 2002. **55**(5): p. 321-5.

18. Soslow, R.A., et al., *Clinicopathologic analysis of 187 high-grade endometrial carcinomas of different histologic subtypes: similar outcomes belie distinctive biologic differences*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(7): p. 979-87.
19. Sabatino, S.A., S.L. Stewart, and R.J. Wilson, *Racial and ethnic variations in the incidence of cancers of the uterine corpus, United States, 2001-2003*. J Womens Health (Larchmt), 2009. **18**(3): p. 285-94.
20. Schwartz, S.M., et al., *Exogenous sex hormone use, correlates of endogenous hormone levels, and the incidence of histologic types of sarcoma of the uterus*. Cancer, 1996. **77**(4): p. 717-24.
21. Bland, A.E., et al., *A clinical and biological comparison between malignant mixed mullerian tumors and grade 3 endometrioid endometrial carcinomas*. Int J Gynecol Cancer, 2009. **19**(2): p. 261-5.
22. Yamada, S.D., et al., *Pathologic variables and adjuvant therapy as predictors of recurrence and survival for patients with surgically evaluated carcinosarcoma of the uterus*. Cancer, 2000. **88**(12): p. 2782-6.
23. Silverberg, S.G., et al., *Carcinosarcoma (malignant mixed mesodermal tumor) of the uterus. A Gynecologic Oncology Group pathologic study of 203 cases*. Int J Gynecol Pathol, 1990. **9**(1): p. 1-19.
24. Abargel, A., et al., *Expression of p27 and p53: comparative analysis of uterine carcinosarcoma and endometrial carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**(2): p. 354-9.
25. Berton-Rigaud, D., et al., *Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus review for uterine and ovarian carcinosarcoma*. Int J Gynecol Cancer, 2014. **24**(9 Suppl 3): p. S55-60.
26. Curtis, R.E., et al., *Risk of malignant mixed mullerian tumors after tamoxifen therapy for breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(1): p. 70-4.

27. McCluggage, W.G., *[Uterine carcinosarcoma related to tamoxifen]*. Int J Gynecol Cancer, 2003. **13**(5): p. 697-8; author reply 697-8.
28. Pecorelli, S., *Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **105**(2): p. 103-4.
29. Prat, J., *FIGO staging for uterine sarcomas*. Int J Gynaecol Obstet, 2009. **104**(3): p. 177-8.
30. Zelmanowicz, A., et al., *Evidence for a common etiology for endometrial carcinomas and malignant mixed mullerian tumors*. Gynecol Oncol, 1998. **69**(3): p. 253-7.
31. Lopez-Garcia, M.A. and J. Palacios, *Pathologic and molecular features of uterine carcinosarcomas*. Semin Diagn Pathol, 2010. **27**(4): p. 274-86.
32. Clement, P.B. and R.E. Scully, *Uterine tumors with mixed epithelial and mesenchymal elements*. Semin Diagn Pathol, 1988. **5**(2): p. 199-222.
33. Gilks, C.B., E. Oliva, and R.A. Soslow, *Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2013. **37**(6): p. 874-81.
34. Darvishian, F., et al., *Serous endometrial cancers that mimic endometrioid adenocarcinomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a group of problematic cases*. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(12): p. 1568-78.
35. Lax, S.F., et al., *Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory, and ciliated cell differentiation*. Hum Pathol, 1998. **29**(9): p. 924-31.

36. Reid-Nicholson, M., et al., *Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis*. Mod Pathol, 2006. **19**(8): p. 1091-100.
37. Soslow, R.A., et al., *Cyclin D1 expression in high-grade endometrial carcinomas-association with histologic subtype*. Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**(4): p. 329-34.
38. Vang, R., et al., *Immunohistochemical analysis of clear cell carcinoma of the gynecologic tract*. Int J Gynecol Pathol, 2001. **20**(3): p. 252-9.
39. Soslow, R.A., et al., *Distinctive p53 and mdm2 immunohistochemical expression profiles suggest different pathogenetic pathways in poorly differentiated endometrial carcinoma*. Int J Gynecol Pathol, 1998. **17**(2): p. 129-34.
40. Tashiro, H., et al., *Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies*. Cancer Res, 1997. **57**(18): p. 3935-40.
41. Zheng, W., et al., *p53 immunostaining as a significant adjunct diagnostic method for uterine surface carcinoma: precursor of uterine papillary serous carcinoma*. Am J Surg Pathol, 1998. **22**(12): p. 1463-73.
42. Li, S.K. and A. Martin, *Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored*. Trends Mol Med, 2016. **22**(4): p. 274-89.
43. McCourt, C.K., et al., *Body mass index: relationship to clinical, pathologic and features of microsatellite instability in endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(3): p. 535-9.
44. Cohn, D.E., et al., *Correlation between patient weight and defects in DNA mismatch repair: is this the link between an increased risk of previous cancer in thinner women with endometrial cancer?* Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(1): p. 136-40.

45. *Proceedings of the 28th Bethesda Conference. Practice Guidelines and the Quality of Care. Bethesda, Maryland, October 21-22, 1996.* J Am Coll Cardiol, 1997. **29**(6): p. 1125-79.
46. Cravo, M.L., et al., *Validation and simplification of Bethesda guidelines for identifying apparently sporadic forms of colorectal carcinoma with microsatellite instability.* Cancer, 1999. **85**(4): p. 779-85.
47. Rodriguez-Bigas, M.A., et al., *A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines.* J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(23): p. 1758-62.
48. Catasus, L., et al., *Frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in endometrial carcinoma with microsatellite instability.* Cancer, 2000. **88**(10): p. 2290-7.
49. Kuismanen, S.A., et al., *Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability.* Am J Pathol, 2002. **160**(6): p. 1953-8.
50. Macdonald, N.D., et al., *Molecular differences between RER+ and RER- sporadic endometrial carcinomas in a large population-based series.* Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**(5): p. 957-65.
51. de Leeuw, W.J., et al., *Prediction of a mismatch repair gene defect by microsatellite instability and immunohistochemical analysis in endometrial tumours from HNPCC patients.* J Pathol, 2000. **192**(3): p. 328-35.
52. Gurin, C.C., et al., *Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma.* Cancer Res, 1999. **59**(2): p. 462-6.
53. Schwartz, S., Jr., et al., *Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype.* Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2995-3002.

54. Shia, J., et al., *Routinely assessed morphological features correlate with microsatellite instability status in endometrial cancer*. Hum Pathol, 2008. **39**(1): p. 116-25.
55. Slomovitz, B.M. and R.L. Coleman, *The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(21): p. 5856-64.
56. Cheung, L.W., et al., *High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability*. Cancer Discov, 2011. **1**(2): p. 170-85.
57. Rudd, M.L., et al., *A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110alpha) mutations within primary endometrial carcinomas*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(6): p. 1331-40.
58. Bussaglia, E., et al., *PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases*. Hum Pathol, 2000. **31**(3): p. 312-7.
59. Konopka, B., et al., *Molecular genetic defects in endometrial carcinomas: microsatellite instability, PTEN and beta-catenin (CTNNB1) genes mutations*. J Cancer Res Clin Oncol, 2007. **133**(6): p. 361-71.
60. Konopka, B., et al., *Assessment of the quality and frequency of mutations occurrence in PTEN gene in endometrial carcinomas and hyperplasias*. Cancer Lett, 2002. **178**(1): p. 43-51.
61. Bilbao, C., et al., *The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(3): p. 563-70.
62. Turbiner, J., et al., *Clinicopathological and molecular analysis of endometrial carcinoma associated with tamoxifen*. Mod Pathol, 2008. **21**(8): p. 925-36.

63. Zhou, X.P., et al., *Distinct PTEN mutational spectra in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome-related endometrial carcinomas compared to sporadic microsatellite unstable tumors*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(4): p. 445-50.
64. An, H.J., et al., *Microsatellite instability in endometrioid type endometrial adenocarcinoma is associated with poor prognostic indicators*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(6): p. 846-53.
65. Oda, K., et al., *High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10669-73.
66. Catusus, L., et al., *Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis*. Mod Pathol, 2009. **22**(4): p. 522-9.
67. Urick, M.E., et al., *PIK3RI (p85alpha) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(12): p. 4061-7.
68. Velasco, A., et al., *PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations*. Hum Pathol, 2006. **37**(11): p. 1465-72.
69. Hayes, M.P., W. Douglas, and L.H. Ellenson, *Molecular alterations of EGFR and PIK3CA in uterine serous carcinoma*. Gynecol Oncol, 2009. **113**(3): p. 370-3.
70. McConechy, M.K., et al., *Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas*. J Pathol, 2012. **228**(1): p. 20-30.
71. Konopka, B., et al., *PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrial carcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors*. Hum Pathol, 2011. **42**(11): p. 1710-9.
72. Kang, S., et al., *Mutual exclusiveness between PIK3CA and KRAS mutations in endometrial carcinoma*. Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(6): p. 1339-43.

73. Murali, R., R.A. Soslow, and B. Weigelt, *Classification of endometrial carcinoma: more than two types*. Lancet Oncol, 2014. **15**(7): p. e268-78.
74. Cohen, Y., et al., *AKT1 pleckstrin homology domain E17K activating mutation in endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(1): p. 88-91.
75. Mori, N., et al., *Concomitant activation of AKT with extracellular-regulated kinase 1/2 occurs independently of PTEN or PIK3CA mutations in endometrial cancer and may be associated with favorable prognosis*. Cancer Sci, 2007. **98**(12): p. 1881-8.
76. Shoji, K., et al., *The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas*. Br J Cancer, 2009. **101**(1): p. 145-8.
77. Byron, S.A., et al., *FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30801.
78. Lagarda, H., et al., *K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability*. J Pathol, 2001. **193**(2): p. 193-9.
79. Kawaguchi, M., et al., *Analysis of a correlation between the BRAF V600E mutation and abnormal DNA mismatch repair in patients with sporadic endometrial cancer*. Int J Oncol, 2009. **34**(6): p. 1541-7.
80. Feng, Y.Z., et al., *BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(17): p. 6133-8.
81. Mizumoto, Y., et al., *Activation of ERK1/2 occurs independently of KRAS or BRAF status in endometrial cancer and is associated with favorable prognosis*. Cancer Sci, 2007. **98**(5): p. 652-8.

82. Gatus, S., et al., *FGFR2 alterations in endometrial carcinoma*. Mod Pathol, 2011. **24**(11): p. 1500-10.
83. Pollock, P.M., et al., *Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes*. Oncogene, 2007. **26**(50): p. 7158-62.
84. Moreno-Bueno, G., et al., *Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer*. Oncogene, 2002. **21**(52): p. 7981-90.
85. Saegusa, M., et al., *beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis*. Br J Cancer, 2001. **84**(2): p. 209-17.
86. Tao, M.H. and J.L. Freudenheim, *DNA methylation in endometrial cancer*. Epigenetics, 2010. **5**(6): p. 491-8.
87. Moreno-Bueno, G., et al., *Molecular alterations associated with cyclin D1 overexpression in endometrial cancer*. Int J Cancer, 2004. **110**(2): p. 194-200.
88. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma*. Nature, 2013. **497**(7447): p. 67-73.
89. O'Toole, S.A., et al., *Genome-wide analysis of deoxyribonucleic acid in endometrial cancer using comparative genomic hybridization microarrays*. Int J Gynecol Cancer, 2006. **16**(2): p. 834-42.
90. Salvesen, H.B., et al., *Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4834-9.
91. Samuelson, E., et al., *Recurrent gene amplifications in human type I endometrial adenocarcinoma detected by fluorescence in situ hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. **181**(1): p. 25-30.

92. Stefansson, I.M., H.B. Salvesen, and L.A. Akslen, *Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(7): p. 1242-52.
93. Singh, M., et al., *ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease*. Mod Pathol, 2008. **21**(7): p. 912-23.
94. Reisman, D., S. Glaros, and E.A. Thompson, *The SWI/SNF complex and cancer*. Oncogene, 2009. **28**(14): p. 1653-68.
95. Sif, S., et al., *Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes*. Genes Dev, 2001. **15**(5): p. 603-18.
96. Shigetomi, H., et al., *The role of components of the chromatin modification machinery in carcinogenesis of clear cell carcinoma of the ovary (Review)*. Oncol Lett, 2011. **2**(4): p. 591-597.
97. Jones, S., et al., *Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma*. Science, 2010. **330**(6001): p. 228-31.
98. Wiegand, K.C., et al., *ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas*. N Engl J Med, 2010. **363**(16): p. 1532-43.
99. Guan, B., et al., *Mutation and loss of expression of ARID1A in uterine low-grade endometrioid carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2011. **35**(5): p. 625-32.
100. Maeda, D., et al., *Clinicopathological significance of loss of ARID1A immunoreactivity in ovarian clear cell carcinoma*. Int J Mol Sci, 2010. **11**(12): p. 5120-8.
101. Takeda, T., et al., *ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers (Review)*. Oncol Rep, 2016. **35**(2): p. 607-13.

102. Wiegand, K.C., et al., *Loss of BAF250a (ARID1A) is frequent in high-grade endometrial carcinomas*. J Pathol, 2011. **224**(3): p. 328-33.
103. Olson, S.H., et al., *Symposium on advances in endometrial cancer epidemiology and biology*. Gynecol Oncol, 2015. **138**(3): p. 497-500.
104. Lax, S.F., et al., *The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways*. Cancer, 2000. **88**(4): p. 814-24.
105. Moll, U.M., et al., *Uterine papillary serous carcinoma evolves via a p53-driven pathway*. Hum Pathol, 1996. **27**(12): p. 1295-300.
106. Tashiro, H., et al., *p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis*. Am J Pathol, 1997. **150**(1): p. 177-85.
107. Prat, J., et al., *Uterine papillary serous adenocarcinoma. A 10-case study of p53 and c-erbB-2 expression and DNA content*. Cancer, 1994. **74**(6): p. 1778-83.
108. Janiec-Jankowska, A., et al., *TP53 mutations in endometrial cancers: relation to PTEN gene defects*. Int J Gynecol Cancer, 2010. **20**(2): p. 196-202.
109. Pijnenborg, J.M., et al., *TP53 overexpression in recurrent endometrial carcinoma*. Gynecol Oncol, 2006. **100**(2): p. 397-404.
110. Engelsen, I.B., et al., *Pathologic expression of p53 or p16 in preoperative curettage specimens identifies high-risk endometrial carcinomas*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **195**(4): p. 979-86.
111. Jongen, V.H., et al., *Aromatase, cyclooxygenase 2, HER-2/neu, and p53 as prognostic factors in endometrioid endometrial cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2009. **19**(4): p. 670-6.

112. Lee, E.J., et al., *p53 alteration independently predicts poor outcomes in patients with endometrial cancer: a clinicopathologic study of 131 cases and literature review*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(3): p. 533-8.
113. Santin, A.D., et al., *Overexpression of HER-2/neu in uterine serous papillary cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(5): p. 1271-9.
114. Slomovitz, B.M., et al., *Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma*. J Clin Oncol, 2004. **22**(15): p. 3126-32.
115. Habermann, J.K., et al., *Genomic instability influences the transcriptome and proteome in endometrial cancer subtypes*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 132.
116. Pradhan, M., et al., *Image cytometry DNA ploidy correlates with histological subtypes in endometrial carcinomas*. Mod Pathol, 2006. **19**(9): p. 1227-35.
117. Lundgren, C., et al., *Prognostic factors in surgical stage I endometrial carcinoma*. Acta Oncol, 2004. **43**(1): p. 49-56.
118. Pradhan, M., et al., *Prognostic importance of DNA ploidy and DNA index in stage I and II endometrioid adenocarcinoma of the endometrium*. Ann Oncol, 2012. **23**(5): p. 1178-84.
119. Suehiro, Y., et al., *Aneuploidy predicts outcome in patients with endometrial carcinoma and is related to lack of CDH13 hypermethylation*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3354-61.
120. Wik, E., et al., *Deoxyribonucleic acid ploidy in endometrial carcinoma: a reproducible and valid prognostic marker in a routine diagnostic setting*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **201**(6): p. 603 e1-7.
121. Fles, R., et al., *Genomic profile of endometrial tumors depends on morphological subtype, not on tamoxifen exposure*. Genes Chromosomes Cancer, 2010. **49**(8): p. 699-710.

122. Levan, K., et al., *Chromosomal alterations in 98 endometrioid adenocarcinomas analyzed with comparative genomic hybridization*. Cytogenet Genome Res, 2006. **115**(1): p. 16-22.
123. Micci, F., et al., *Genomic aberrations in carcinomas of the uterine corpus*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **40**(3): p. 229-46.
124. Pere, H., et al., *Distinct chromosomal imbalances in uterine serous and endometrioid carcinomas*. Cancer Res, 1998. **58**(5): p. 892-5.
125. Schulten, H.J., et al., *Overrepresentation of 8q in carcinosarcomas and endometrial adenocarcinomas*. Am J Clin Pathol, 2004. **122**(4): p. 546-51.
126. Suzuki, A., et al., *Frequent gains on chromosome arms 1q and/or 8q in human endometrial cancer*. Hum Genet, 1997. **100**(5-6): p. 629-36.
127. Kildal, W., et al., *Genomic imbalances in endometrial adenocarcinomas - comparison of DNA ploidy, karyotyping and comparative genomic hybridization*. Mol Oncol, 2012. **6**(1): p. 98-107.
128. Artioli, G., et al., *Rare uterine cancer: carcinosarcomas. Review from histology to treatment*. Crit Rev Oncol Hematol, 2015. **94**(1): p. 98-104.
129. El-Nashar, S.A. and A. Mariani, *Uterine carcinosarcoma*. Clin Obstet Gynecol, 2011. **54**(2): p. 292-304.
130. Gonzalez Bosquet, J., et al., *The impact of multi-modal therapy on survival for uterine carcinosarcomas*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(3): p. 419-23.
131. McCluggage, W.G., *Uterine carcinosarcomas (malignant mixed Mullerian tumors) are metaplastic carcinomas*. Int J Gynecol Cancer, 2002. **12**(6): p. 687-90.

132. Emoto, M., et al., *Characteristics of cloned cells of mixed mullerian tumor of the human uterus. Carcinoma cells showing myogenic differentiation in vitro*. Cancer, 1993. **71**(10): p. 3065-75.
133. Wada, H., et al., *Molecular evidence that most but not all carcinosarcomas of the uterus are combination tumors*. Cancer Res, 1997. **57**(23): p. 5379-85.
134. Watanabe, M., et al., *Carcinosarcoma of the uterus: immunohistochemical and genetic analysis of clonality of one case*. Gynecol Oncol, 2001. **82**(3): p. 563-7.
135. Abeln, E.C., et al., *Molecular genetic evidence for the conversion hypothesis of the origin of malignant mixed mullerian tumours*. J Pathol, 1997. **183**(4): p. 424-31.
136. Lax, S.F., *Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification*. Virchows Arch, 2004. **444**(3): p. 213-23.
137. Taylor, N.P., et al., *DNA mismatch repair and TP53 defects are early events in uterine carcinosarcoma tumorigenesis*. Mod Pathol, 2006. **19**(10): p. 1333-8.
138. Kounelis, S., et al., *Carcinosarcomas (malignant mixed mullerian tumors) of the female genital tract: comparative molecular analysis of epithelial and mesenchymal components*. Hum Pathol, 1998. **29**(1): p. 82-7.
139. Biscuola, M., et al., *Oncogene alterations in endometrial carcinosarcomas*. Hum Pathol, 2013. **44**(5): p. 852-9.
140. Cimbaluk, D., et al., *Uterine carcinosarcoma: immunohistochemical studies on tissue microarrays with focus on potential therapeutic targets*. Gynecol Oncol, 2007. **105**(1): p. 138-44.

141. Livasy, C.A., et al., *EGFR expression and HER2/neu overexpression/amplification in endometrial carcinosarcoma*. Gynecol Oncol, 2006. **100**(1): p. 101-6.
142. Schipf, A., et al., *Molecular genetic aberrations of ovarian and uterine carcinosarcomas--a CGH and FISH study*. Virchows Arch, 2008. **452**(3): p. 259-68.
143. Growdon, W.B., et al., *Tissue-specific signatures of activating PIK3CA and RAS mutations in carcinosarcomas of gynecologic origin*. Gynecol Oncol, 2011. **121**(1): p. 212-7.
144. Murray, S., et al., *Low frequency of somatic mutations in uterine sarcomas: a molecular analysis and review of the literature*. Mutat Res, 2010. **686**(1-2): p. 68-73.
145. Jones, S., et al., *Genomic analyses of gynaecologic carcinosarcomas reveal frequent mutations in chromatin remodelling genes*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5006.
146. McConechy, M.K., et al., *In-depth molecular profiling of the biphasic components of uterine carcinosarcomas*. J Pathol Clin Res, 2015. **1**(3): p. 173-85.
147. Moreno-Bueno, G., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer*. Oncogene, 2008. **27**(55): p. 6958-69.
148. Romero-Perez, L., et al., *Molecular events in endometrial carcinosarcomas and the role of high mobility group AT-hook 2 in endometrial carcinogenesis*. Hum Pathol, 2013. **44**(2): p. 244-54.
149. Sarrio, D., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 989-97.

150. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
151. Castilla, M.A., et al., *MicroRNA-200 family modulation in distinct breast cancer phenotypes*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47709.
152. Castilla, M.A., et al., *Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma*. J Pathol, 2011. **223**(1): p. 72-80.
153. Bayani, J., et al., *Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells*. Semin Cancer Biol, 2007. **17**(1): p. 5-18.
154. Geigl, J.B., et al., *Defining 'chromosomal instability'*. Trends Genet, 2008. **24**(2): p. 64-9.
155. McGranahan, N., et al., *Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges*. EMBO Rep, 2012. **13**(6): p. 528-38.
156. Pikor, L., et al., *The detection and implication of genome instability in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2013. **32**(3-4): p. 341-52.
157. Talhouk, A., et al., *Molecular classification of endometrial carcinoma on diagnostic specimens is highly concordant with final hysterectomy: Earlier prognostic information to guide treatment*. Gynecol Oncol, 2016. **143**(1): p. 46-53.
158. Fujii, H., et al., *Frequent genetic heterogeneity in the clonal evolution of gynecological carcinosarcoma and its influence on phenotypic diversity*. Cancer Res, 2000. **60**(1): p. 114-20.
159. Jin, Z., et al., *Carcinosarcomas (malignant mullerian mixed tumors) of the uterus and ovary: a genetic study with special reference to histogenesis*. Int J Gynecol Pathol, 2003. **22**(4): p. 368-73.

160. Romero-Perez, L., et al., *A role for the transducer of the Hippo pathway, TAZ, in the development of aggressive types of endometrial cancer*. Mod Pathol, 2015. **28**(11): p. 1492-503.
161. Buza, N. and F.A. Tavassoli, *Comparative analysis of P16 and P53 expression in uterine malignant mixed mullerian tumors*. Int J Gynecol Pathol, 2009. **28**(6): p. 514-21.
162. de Jong, R.A., et al., *Molecular markers and clinical behavior of uterine carcinosarcomas: focus on the epithelial tumor component*. Mod Pathol, 2011. **24**(10): p. 1368-79.
163. Liu, F.S., et al., *Mutation and overexpression of the p53 tumor suppressor gene frequently occurs in uterine and ovarian sarcomas*. Obstet Gynecol, 1994. **83**(1): p. 118-24.
164. Kanthan, R., J.L. Senger, and D. Diudea, *Malignant mixed Mullerian tumors of the uterus: histopathological evaluation of cell cycle and apoptotic regulatory proteins*. World J Surg Oncol, 2010. **8**: p. 60.
165. Keeling, L., et al., *Uterine carcinosarcoma with p53-positive intraepithelial component*. Histopathology, 2011. **59**(6): p. 1277-8.
166. Mayall, F., et al., *p53 immunostaining suggests that uterine carcinosarcomas are monoclonal*. Histopathology, 1994. **24**(3): p. 211-4.
167. Robinson-Bennett, B., R.Z. Belch, and A.C. Han, *Loss of p16 in recurrent malignant mixed mullerian tumors of the uterus*. Int J Gynecol Cancer, 2006. **16**(3): p. 1354-7.
168. Wolfson, A.H., et al., *A gynecologic oncology group randomized phase III trial of whole abdominal irradiation (WAI) vs. cisplatin-ifosfamide and mesna (CIM) as post-surgical therapy in stage I-IV carcinosarcoma (CS) of the uterus*. Gynecol Oncol, 2007. **107**(2): p. 177-85.

169. Bansal, N., V. Yendluri, and R.M. Wenham, *The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies*. Cancer Control, 2009. **16**(1): p. 8-13.
170. Hayes, M.P. and L.H. Ellenson, *Molecular alterations in uterine serous carcinoma*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(2): p. 286-9.
171. Cherniack, A.D., et al., *Integrated Molecular Characterization of Uterine Carcinosarcoma*. Cancer Cell, 2017. **31**(3): p. 411-423.
172. Jaiswal, B.S., et al., *Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5717.
173. Mohseni, M. and B.H. Park, *PIK3CA and KRAS mutations predict for response to everolimus therapy: now that's RAD001*. J Clin Invest, 2010. **120**(8): p. 2655-8.
174. Adams, S.F., et al., *PDGFR-alpha as a potential therapeutic target in uterine sarcomas*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(3): p. 524-8.
175. Medinger, M., et al., *c-kit (CD117) expression in human tumors and its prognostic value: an immunohistochemical analysis*. Pathol Oncol Res, 2010. **16**(3): p. 295-301.
176. Rushing, R.S., et al., *Uterine sarcomas express KIT protein but lack mutation(s) in exon 11 or 17 of c-KIT*. Gynecol Oncol, 2003. **91**(1): p. 9-14.
177. Sawada, M., et al., *Different expression patterns of KIT, EGFR, and HER-2 (c-erbB-2) oncoproteins between epithelial and mesenchymal components in uterine carcinosarcoma*. Cancer Sci, 2003. **94**(11): p. 986-91.
178. Stella, G.M., S. Benvenuti, and P.M. Comoglio, *Targeting the MET oncogene in cancer and metastases*. Expert Opin Investig Drugs, 2010. **19**(11): p. 1381-94.

179. Tyner, J.W., et al., *MET receptor sequence variants R970C and T992I lack transforming capacity*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6233-7.
180. Rodriguez, F.J., M.A. Vizcaino, and M.T. Lin, *Recent Advances on the Molecular Pathology of Glial Neoplasms in Children and Adults*. J Mol Diagn, 2016. **18**(5): p. 620-634.
181. Stenman, G., M.K. Andersson, and Y. Andren, *New tricks from an old oncogene: gene fusion and copy number alterations of MYB in human cancer*. Cell Cycle, 2010. **9**(15): p. 2986-95.
182. Kauraniemi, P., et al., *MYB oncogene amplification in hereditary BRCA1 breast cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(19): p. 5323-8.
183. Wallrapp, C., et al., *Characterization of a high copy number amplification at 6q24 in pancreatic cancer identifies c-myb as a candidate oncogene*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3135-9.
184. Abasolo, A., et al., *Application of fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in melanocytic lesions, using paraffin wax-embedded tissues and imprint-cytology specimens*. Clin Exp Dermatol, 2012. **37**(8): p. 838-43.
185. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address, a.a.d.h.e. and N. Cancer Genome Atlas Research, *Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2017. **32**(2): p. 185-203 e13.
186. Jarosova, M., et al., *Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients*. Am J Hematol, 2017. **92**(10): p. E604-E607.
187. Pietsch, T., et al., *Prognostic significance of clinical, histopathological, and molecular characteristics of medulloblastomas in the prospective HIT2000 multicenter clinical trial cohort*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(1): p. 137-49.

188. Olsen, T.K., et al., *Genomic characterization of ependymomas reveals 6q loss as the most common aberration*. *Oncol Rep*, 2014. **32**(2): p. 483-90.
189. Dogrusoz, M. and M.J. Jager, *Genetic prognostication in uveal melanoma*. *Acta Ophthalmol*, 2017.
190. Williamson, S.R., et al., *Renal Cell Carcinoma With Chromosome 6p Amplification Including the TFEB Gene: A Novel Mechanism of Tumor Pathogenesis?* *Am J Surg Pathol*, 2017. **41**(3): p. 287-298.
191. Hecht, J.L. and G.L. Mutter, *Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(29): p. 4783-91.
192. Risinger, J.I., et al., *PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers*. *Cancer Res*, 1997. **57**(21): p. 4736-8.
193. Phin, S., M.W. Moore, and P.D. Cotter, *Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 240.
194. Vidotto, T., D.G. Tiezzi, and J.A. Squire, *Distinct subtypes of genomic PTEN deletion size influence the landscape of aneuploidy and outcome in prostate cancer*. *Mol Cytogenet*, 2018. **11**: p. 1.
195. Srividya, M.R., et al., *Homozygous 10q23/PTEN deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients*. *Neuropathology*, 2011. **31**(4): p. 376-83.
196. Nakajima, N., et al., *BRAF V600E, TERT promoter mutations and CDKN2A/B homozygous deletions are frequent in epithelioid glioblastomas: a histological and molecular analysis focusing on intratumoral heterogeneity*. *Brain Pathol*, 2017.

197. Hamasaki, M., et al., *Low homozygous/high heterozygous deletion status by p16 FISH correlates with a better prognostic group than high homozygous deletion status in malignant pleural mesothelioma*. Lung Cancer, 2016. **99**: p. 155-61.
198. Hu, Z.Y., et al., *Aberrant promoter hypermethylation of p16 gene in endometrial carcinoma*. Tumour Biol, 2015. **36**(3): p. 1487-91.
199. Zhang, Q.Y., et al., *Status and significance of CpG island methylator phenotype in endometrial cancer*. Gynecol Obstet Invest, 2011. **72**(3): p. 183-91.
200. Thomay, K., et al., *Telomere shortening, TP53 mutations and deletions in chronic lymphocytic leukemia result in increased chromosomal instability and breakpoint clustering in heterochromatic regions*. Ann Hematol, 2017. **96**(9): p. 1493-1500.
201. Zhao, S., et al., *Mutational landscape of uterine and ovarian carcinosarcomas implicates histone genes in epithelial-mesenchymal transition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(43): p. 12238-12243.
202. Gunawan, B., et al., *Polysomy 8 in three cases of homologous malignant mixed Mullerian tumors of the uterus*. Anticancer Res, 2003. **23**(2B): p. 1379-83.
203. Gil-Benso, R., et al., *Cytogenetic findings in malignant mixed mesodermal tumors of the uterus*. Cancer Genet Cytogenet, 1997. **99**(2): p. 121-5.
204. Loeb, L.A., *Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(6): p. 450-7.
205. Oltmann, J., et al., *Aneuploidy, TP53 mutation, and amplification of MYC correlate with increased intratumor heterogeneity and poor prognosis of breast cancer patients*. Genes Chromosomes Cancer, 2018. **57**(4): p. 165-175.
206. Koshiyama, D.B., et al., *Frequency and clinical significance of chromosome 7 and 10 aneuploidies, amplification of the EGFR gene, deletion of PTEN and TP53*

- genes, and 1p/19q deficiency in a sample of adult patients diagnosed with glioblastoma from Southern Brazil. J Neurooncol, 2017. 135(3): p. 465-472.*
207. Carter, S.L., et al., *Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. Nat Biotechnol, 2012. 30(5): p. 413-21.*
 208. Sreekantaiah, C., U.N. Rao, and A.A. Sandberg, *Complex karyotypic aberrations, including i(12p), in malignant mixed mullerian tumor of uterus. Cancer Genet Cytogenet, 1992. 60(1): p. 78-81.*
 209. Matias-Guiu, X. and J. Prat, *Molecular pathology of endometrial carcinoma. Histopathology, 2013. 62(1): p. 111-23.*
 210. Hussein, Y.R., et al., *The Genomic Heterogeneity of FIGO Grade 3 Endometrioid Carcinoma Impacts Diagnostic Accuracy and Reproducibility. Int J Gynecol Pathol, 2016. 35(1): p. 16-24.*
 211. Silva, E.G., M.T. Deavers, and A. Malpica, *Undifferentiated carcinoma of the endometrium: a review. Pathology, 2007. 39(1): p. 134-8.*
 212. Rosa-Rosa, J.M., et al., *Molecular genetic heterogeneity in undifferentiated endometrial carcinomas. Mod Pathol, 2016. 29(12): p. 1594.*
 213. Kuhn, E., et al., *Molecular characterization of undifferentiated carcinoma associated with endometrioid carcinoma. Am J Surg Pathol, 2014. 38(5): p. 660-5.*
 214. Alvarez, T., et al., *Molecular profile of grade 3 endometrioid endometrial carcinoma: is it a type I or type II endometrial carcinoma? Am J Surg Pathol, 2012. 36(5): p. 753-61.*
 215. Buza, N., et al., *Toward standard HER2 testing of endometrial serous carcinoma: 4-year experience at a large academic center and recommendations for clinical practice. Mod Pathol, 2013. 26(12): p. 1605-12.*

216. Buza, N. and P. Hui, *Marked heterogeneity of HER2/NEU gene amplification in endometrial serous carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2013. **52**(12): p. 1178-86.
217. O'Hara, A.J. and D.W. Bell, *The genomics and genetics of endometrial cancer*. Adv Genomics Genet, 2012. **2012**(2): p. 33-47.
218. Talhouk, A., et al., *A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers*. Br J Cancer, 2015. **113**(2): p. 299-310.
219. Kommoss, S., et al., *Final Validation of the ProMisE Molecular Classifier for Endometrial Carcinoma in a Large Population-based Case Series*. Ann Oncol, 2018.
220. Talhouk, A., et al., *Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer*. Cancer, 2017. **123**(5): p. 802-813.
221. Stelloo, E., et al., *Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative*. Mod Pathol, 2015. **28**(6): p. 836-44.

ANEXO I: PUBLICACIONES

A continuación se especifican las publicaciones cuyos resultados se muestran en el presente trabajo de tesis:

- **M. Biscuola**, K. Van de Vijver, M.A. Castilla, L. Romero-Pérez, M.A. López-García, J. Díaz-Martín, X. Matias-Guiu, E. Oliva, J. Palacios Calvo. “*Oncogene alterations in endometrial carcinosarcomas.*” Hum Pathol, 2013. **44**(5): p. 852-9.
- J.M. Rosa-Rosa, S. Leskela, E. Cristóbal-Lana, A. Santón, M.A. López-García, G. Muñoz, B. Pérez-Mies, **M. Biscuola**, J. Prat, E. Oliva, R.A. Soslow, X. Matias-Guiu, and J. Palacios. “*Molecular genetic heterogeneity in undifferentiated endometrial carcinomas.*” Mod Pathol, 2016. **29**(12): p. 1594.

